



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PRODUTORA DE
BIOFILMES EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE
SUPERFÍCIES DO AMBIENTE FABRIL**

TERESA CABRAL CHORA CLAUDINO DAS NEVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Ana Cristina Lobo Vilela

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PRODUTORA DE
BIOFILMES EM ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE
SUPERFÍCIES DO AMBIENTE FABRIL**

TERESA CABRAL CHORA CLAUDINO DAS NEVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Ana Cristina Lobo Vilela

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2012

LISBOA

Na Natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.

Lavoisier

Dedicatória

À minha mãe

Ao meu pai

*O Jehova
Quam ampla sunt Tua Opera!
Quam sapienter ea fecisti!
Quam plena est Terra possessione Tua!*

Carl von Linné

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e restante família, não podendo deixar de citar o meu sobrinho Bernardo que nasceu durante este meu último percurso académico e a minha Mila que tanta sopa me fez durante estes anos na Faculdade e pela tanta água dos Águias me levaste a beber, até porque se não fossem todos vocês, eu provavelmente seria metade do que sou.

À Prof. Dr.^a Maria João Fraqueza pela bondade, amizade e delicadeza com que sempre me aconselhou e ensinou, um grande bem-haja e um muito obrigada!

À Prof. Marília Ferreira e ao Prof. Dr. António Barreto, pela força e simpatia transmitidas neste percurso.

À Dr.^a Teresa Lemsaddek pela ajuda no meu trabalho e amizade durante os almoços e convívios que passaram por nós, à Lena pelas conversas de fim de tarde (ou manhãs) e pelos cigarros que partilhámos em tantas ideias e dúvidas, à Zézinha por todas as chamadas de atenção, ensinamentos e... desculpe-me quando não limpo as balanças, e à Ju, que me tratou sempre como se nos conhecêssemos há séculos.

À minha “mestra” Sílvia Gonçalves, porque sem ti provavelmente não teria terminado este estágio e aos meus colegas, agora amigos, Ana, Zé, Sara, Cláudia, Ana Rita e os tantos outros com quem me cruzei, porque o laboratório com a vossa presença é muito mais divertido, e foi e será sempre um prazer trabalhar convosco!

Aos meus colegas do MSA, por esta aventura que passámos juntos, em especial à Joana Mendonça e ao João Belo, porque iniciámo-nos juntos no Piso 2 e só por isso tudo se tornou mais alegre!

E visto que este estágio é apenas uma parte da minha formação académica, não posso deixar de agradecer a todos os professores que me ensinaram tanto e aos meus colegas e amigos do MIMV que tantas alegrias me deram ao longo destes anos.

À Teresa Duarte, Ivo Espírito Santo, Zé Botte, André Almeida (não esperes mais por mim!), Bubú!, Lara, Daniela, Ivo Malta, Ana Roça, Júlia, Tina, Sara Brito, Carolina Encarnação, não esquecendo o Dinis Vinagre que nos caiu dos céus aos trambolhões e nos trouxe ainda mais alegria às nossas vidas, assim como tantos e tantos outros com quem tive o prazer de estudar, trabalhar, rir, chorar, sempre com uma amizade e companheirismo tão grandes que se torna difícil de descrever! Veterinária Cilindra!!!

E tu, Nuno Leitão, que aqui estás à minha frente (e sinceramente, nem podia esperar outra coisa...), amigo da FMV, amigo de Alpiarça e de Lisboa (e do resto do Mundo também), companheiro de luta, compadre, tu que estás para a Terra como Deus está no céu, um muito obrigada por todos estes anos e momentos, porque sem ti isto faria metade do sentido ou até menos, até...

Aos meus amigos, a Maltinha das Coisinhas e aos outros, que prezo de igual forma, porque sim! Porque posso e porque quero conviver convosco nos momentos piores e melhores, nos mais alegres e tristes, e porque nos damos forças para continuar neste Mundo de loucos! Não posso, no entanto, deixar de expressar o meu especial agradecimento à Joana Marques e ao Vasco Santos pela calma transmitida e algumas das imagens e gráficos desta dissertação.

À minha Zanina, que foi um anjo caído do céu, um bicho tonto que me acompanha sempre, independentemente do caminho que escolho!

E por fim, mas não por último, à Caterina, porque és a minha maior enzima e ao mesmo tempo um valente carburador que não me deixou nunca ficar para trás!

Gostaria, em tom de despedida, de saudar os amigos e familiares que nos últimos anos partiram e me deixaram tamanho vazio, aos meus avós, ao Diogo, ao Miguel, ao Branha e à Nina, porque esta tese que me abre uma nova etapa é também para vocês!

Um Bem-Haja a todos e muito, Muito Obrigada!

Caracterização e avaliação da capacidade produtora de biofilmes em estafilococos coagulase negativos isolados de superfícies do ambiente fabril

Resumo

Os objectivos deste estudo prendem-se com a identificação e caracterização tecnológica de isolados de estafilococos coagulase negativos provenientes de diferentes salsicharias tradicionais situadas no Alentejo e superfícies do ambiente fabril, avaliando-se a sua capacidade em formar biofilmes e persistência pós-limpeza e desinfecção.

Isolaram-se amostras (N=78) de 4 superfícies diferentes (misturadora, picadora, parede da sala de enchimento, enchedora) provenientes de 3 Fábricas do Alentejo, após o qual se fez identificação de espécies de *Staphylococcus*. Caracterizou-se a sua aptidão tecnológica pelas provas da actividade lipolítica, proteolítica e nitrato-redutase. Para a avaliação fenotípica da capacidade de formar biofilmes utilizou-se o método Congo Red Agar - CRA, caracterizando-se os isolados de acordo com a cor das colónias às 24h e 48h de incubação, e na caracterização genotípica identificaram-se dois genes implicados na formação de biofilme: *ica* e Bap. Encontraram-se 35 isolados coincidentes com o género *Staphylococcus*, sendo dominantes 3 espécies diferentes: *S. xylosus* (N=19), *S. saprophyticus* (N=11) e *S. equorum* (N=5). A espécie *S. equorum* foi apenas isolada na Fábrica A, tendo aparecido na picadora (N=4) e na parede da sala da enchedora (N=1). A enchedora apresentava apenas isolados de *S. saprophyticus* (S4; N=9), enquanto a misturadora apresentava apenas *S. xylosus* (S1; N=7). Tanto a picadora como a parede da sala de enchimento apresentavam isolados das 3 espécies. Apenas 20 dos 35 *Staphylococcus* apresentaram actividade lipolítica, 19 destes identificados como *S. xylosus*. A actividade proteolítica foi evidenciada por apenas 7 isolados (*S. equorum* e *S. xylosus*) e todos pertencentes à Fábrica A. Das 3 espécies identificadas como CNS, 26 isolados apresentaram actividade nitrato-redutase, havendo isolados das 3 espécies consideradas. Maioritariamente os isolados em estudo (N=33) foram formadores de visco/biofilme pelo método fenotípico.

Todas as amostras onde se detectou o gene *ica* eram pertencentes à espécie *S. xylosus* (N=5) e expressavam forte capacidade (++) formadora de biofilmes (N=5:ica:++;CRA:++). Dos isolados identificados com o gene Bap (N=6), havia estirpes das espécies *S. xylosus* (N=4) e *S. saprophyticus* (N=2), havendo 1 destes que apresentou uma fraca capacidade formadora de biofilme (+) (N=5:Bap++;CRA++ e N=1:Bap++;CRA+). Duas estirpes de *S. xylosus* (S3B5 e S3B7) foram positivas para o *ica* e para o Bap simultaneamente (N=2:ica+;Bap+). Considerou-se a estirpe *S. xylosus* S2M6 com potencial utilização como *starter* uma vez que apresentava características de interesse tecnológico e era fraca formadora de biofilme, não apresentando nenhum dos genes *ica* e Bap.

Palavras-chave: biofilmes, *Staphylococcus* coagulase negativos, superfícies ambiente fabril, *starters*

Characterization and forming biofilms ability from Coagulase Negative Staphylococci isolates in meat processing surfaces

Abstract

The aims of this work were the identification and technological characterization of *Staphylococci* isolates obtained from 4 different environment surfaces in 3 meat processing workshops from Alentejo region and to determine their ability to form biofilms.

There were 78 samples isolated from 4 environment surfaces (mixing machine, mincing machine, wall from the stuffing room and stuffing machine) in 3 different meat processing workshops and they were identified in order to determine isolates from the genus *Staphylococcus*. It has also been characterized their technological ability for lipolytic, proteolytic and reducing-nitrate activities. For the phenotypic evaluation to form biofilms we used the Congo Red Agar method and by PCR were searched the *ica* and Bap genes. 35 isolates were identified by PCR as *Staphylococcus*: 19 *S. xylosus*, 11 *S. saprophyticus* and 5 *S. equorum*. *S. equorum* (N=5) was only found in workshop A at the surface of mincing machine (N=4) and on the wall of stuffing room (N=1). The stuffing machine had only isolates from *S. saprophyticus* (S4; N=9), and the mixing machine presented only *S. xylosus* (S1; N=7). The mincing machines as well the wall of stuffing room had isolates from the 3 species. 20 of the 35 CNS presented lipolytic activity and 19 of these were *S. xylosus*. Only 7 isolates (*S. xylosus* and *S. equorum*) had proteolytic activity and they were all from workshop A. The reducing-nitrate activity was presented by 23 CNS from the 3 identified species. 33 *Staphylococcus* were strong biofilm formers but only 5 were positive for *ica* gene and 6 for Bap gene. Every *ica* positive were *S. xylosus* and all were strong biofilm formers (N=5:ica+;CRA:++). The Bap positive isolates were from *S. xylosus* (N=4) and *S. saprophyticus* (N=2) species. From the Bap positive isolates it was found one weak positive (N=5:Bap+;CRA++ and N=1:Bap+;CRA+). Two strains of *S. xylosus* (S3B5 and S3B7) were positive for *ica* and for Bap genes simultaneously.

We considered *S. xylosus* S2M6 as a potential strain starter because it presented technological abilities and was a weak biofilm former and didn't present *ica* nor Bap genes.

Key-words: biofilms, Coagulase Negative Staphylococci, surfaces on meat processing plants, starters

Índice geral

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 1. STARTERS NA INDÚSTRIA ALIMENTAR | 2 |
| 1.1 Definição e utilização de <i>starters</i> | 2 |
| 1.2 Principais <i>starters</i> utilizados no processamento alimentar | 3 |
| 1.3 Bactérias estafilocócicas utilizadas como <i>starters</i> | 3 |
| 1.4 Persistência da microbiota no ambiente fabril | 5 |
| 2. ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO | 6 |
| 2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> | 6 |
| 2.1.1 Considerações históricas | 6 |
| 2.1.2 Caracterização do gênero <i>Staphylococcus</i> | 7 |
| 2.1.2.1 <i>S. equorum</i> | 9 |
| 2.1.2.2 <i>S. xylosus</i> | 10 |
| 2.1.2.3 <i>S. saprophyticus</i> | 11 |
| 3. PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS | 12 |
| 3.1 Considerações históricas e gerais | 12 |
| 3.2 Fases do processamento de enchidos..... | 12 |
| 3.2.1 Fase de escolha | 13 |
| 3.2.2 Fase de miga..... | 13 |
| 3.2.3 Fase de preparação da massa e condimentação | 13 |
| 3.2.4 Fase de maturação..... | 14 |
| 3.2.5 Fase de enchimento | 14 |
| 3.2.6 Fase de cura | 15 |
| 3.2.7 Fase de embalagem | 15 |
| 3.3 Requisitos importantes para uma fábrica de processamento de enchidos | 16 |
| 3.3.1 Considerações sobre o <i>layout</i> das salas de uma fábrica de enchidos | 16 |
| 3.3.2 Origem dos materiais de construção, pisos e paredes | 17 |
| 3.3.3 Saneamento e Higiene | 18 |
| 3.4 Requisitos de construção, funcionamento e higiene da maquinaria fabril | 18 |
| 3.4.1 Picadora | 19 |
| 3.4.2 Misturadora | 20 |
| 3.4.3 Enchedora | 20 |
| 4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS | 21 |
| 4.1 Biofilmes | 21 |
| 4.1.1 Considerações Históricas | 21 |
| 4.1.2 Definição de biofilme | 21 |
| 4.2 Estrutura e composição do biofilme | 22 |
| 4.3 Etapas do processo de formação..... | 23 |
| 4.4 Propriedades da adesão a diferentes superfícies | 24 |
| 4.4.1 Interações moleculares de adesão | 24 |
| 4.4.2 Características inerentes à relação de ligação entre superfície-célula..... | 26 |
| 4.5 Características da formação de biofilmes em bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> | 27 |
| 4.5.1 Características de adesão, maturação e desintegração por <i>Staphylococcus</i> | 27 |
| 4.5.1.1 Gene <i>ica</i> | 27 |
| 4.5.1.2 Gene <i>Bap</i> | 29 |
| 4.5.1.3 Outros mecanismos inerentes à formação de biofilmes | 30 |
| II - TRABALHO EXPERIMENTAL | 32 |
| 1. OBJECTIVOS | 32 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 2.1 Origem dos isolados: colheita de amostras | 32 |
| 2.2 Conservação de isolados..... | 33 |
| 2.3 Cultivo para revivificação..... | 33 |
| 2.4 Caracterização fenotípica dos isolados | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.1 Observação visual das colónias | 33 |
| 2.4.2 Catalase | 33 |
| 2.4.3 Oxidase | 34 |
| 2.4.4 Coloração Gram | 34 |
| 2.4.5 Critérios de selecção de isolados | 34 |
| 2.5 Identificação genética de isolados de <i>Staphylococcus</i> | 35 |
| 2.5.1 Cultura de isolados | 35 |
| 2.5.2 Extracção de DNA | 35 |
| 2.5.3 Identificação genética de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. simulans</i> e <i>S. equorum</i> | 35 |
| 2.5.3.1. Condições de PCR multiplex para a identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i> e <i>S. saprophyticus</i> | 35 |
| 2.5.3.2 Condições de PCR para a identificação de <i>S. carnosus</i> , <i>S. simulans</i> e <i>S. equorum</i> | 36 |
| 2.5.3.3 Mix de Reagentes – PCR multiplex para identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>Staphylococcus</i> género | 37 |
| 2.5.3.4 Mix de Reagentes – PCRs para identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>S. simulans</i> e <i>S. equorum</i> | 37 |
| 2.5.3.5 Condições de electroforese para revelação dos produtos das reacções de PCR | 38 |
| 2.6 Caracterização tecnológica das espécies de <i>Staphylococcus</i> presentes em superfícies do ambiente fabril | 38 |
| 2.6.1 Prova da Actividade Lipolítica | 38 |
| 2.6.2 Prova da Actividade Proteolítica | 39 |
| 2.6.3 Prova da Actividade Nitrato-Redutase | 39 |
| 2.7 Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos para a capacidade de formar biofilme | 39 |
| 2.7.1 Caracterização fenotípica da capacidade de formação de visco | 39 |
| 2.7.2 Identificação dos genes <i>ica</i> e <i>Bap</i> | 40 |
| 2.7.2.1 Condições de PCR | 40 |
| 2.7.2.2 Mix de reagentes | 41 |
| 2.7.2.3 Condições de electroforese para revelação dos produtos das reacções de PCR para identificação dos genes <i>ica</i> e <i>Bap</i> | 41 |
| 2.8 Análise Estatística | 41 |
| 3. RESULTADOS | 41 |
| 3.1 Identificação de <i>Staphylococcus</i> nas superfícies de trabalho do ambiente fabri | 41 |
| 3.2 Caracterização tecnológica das espécies de <i>Staphylococcus</i> presentes nas diferentes superfícies do ambiente fabril | 47 |
| 3.3 Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Staphylococcus</i> quanto à capacidade de formar biofilmes | 48 |
| 3.3.1 Avaliação da capacidade de formar biofilme | 48 |
| 3.3.2 Caracterização genotípica da capacidade de formar biofilmes | 50 |
| 3.3.2.1 Identificação do Gene <i>ica</i> | 50 |
| 3.3.2.2 Identificação do Gene <i>Bap</i> | 51 |
| 3.4 Relação entre as características tecnológicas e as avaliações fenotípicas e genotípicas para a avaliação da formação de biofilmes | 52 |
| 4. CONCLUSÕES | 56 |
| BIBLIOGRAFIA | 58 |
| ANEXOS | 64 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Espécies utilizadas como starters na indústria alimentar..... | 3 |
| Tabela 2 – Percentagens dos compostos do biofilme..... | 22 |
| Tabela 3 – Principais variáveis implícitas na adesão bacteriana e formação de biofilme.... | 24 |
| Tabela 4 – Homólogos do Bap relacionado com a espécie, a percentagem de homologia com o Bap pertencente ao <i>S. aureus</i> e a função que apresenta para a formação de biofilme..... | 29 |
| Tabela 5 – Relação entre as 3 unidades fabris, A, B e C e as amostras colhidas de cada superfície, com a sua denominação | 33 |
| Tabela 6 – Condições do PCR multiplex para as espécies de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> e <i>S. epidermidis</i> , tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers utilizados e controlos positivos de cada espécie..... | 36 |
| Tabela 7 – Condições do PCR para as espécies de <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>S. simulans</i> e <i>S. equorum</i> , tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers utilizados e controlos positivos de cada espécie..... | 37 |
| Tabela 8 – Condições de PCR para os genes <i>ica</i> e Bap, tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers, controlos positivos e controlos negativos de cada gene..... | 40 |
| Tabela 9 – Descrição da contagem de CNS (log ufc/500cm ²), número de isolados iniciais e proporção de isolados presuntivos do género <i>Staphylococcus</i> após testes de avaliação fenotípica, consideradas de acordo com cada fábrica e cada superfície..... | 42 |
| Tabela 10 – Caracterização fenotípica dos isolados provenientes das superfícies do ambiente de três fábricas..... | 42 |
| Tabela 11 – Representação de dupla entrada da relação entre as espécies estafilocócicas encontradas e as suas proporções em cada superfície do ambiente fabril..... | 46 |
| Tabela 12 – Relação entre os resultados positivos nas provas de interesse tecnológico com as diferentes espécies consideradas..... | 47 |
| Tabela 13 – Relação entre a capacidade de produção de biofilme pelo CRA e as diferentes espécies, às 24h e 48h..... | 49 |
| Tabela 14 – Relação entre o número de bactérias de cada espécie e suas capacidades de formar visco/biofilme às 24h e às 48h, de acordo com as diferentes superfícies do ambiente fabril..... | 50 |
| Tabela 15 – Relação entre a Fábrica e correspondentes superfícies com as estirpes identificadas de acordo com as suas características tecnológicas, presença dos genes implícitos na formação de biofilme e capacidade de formação de visco/biofilme após 24h e 48h..... | 54 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema interpretativo das diferenças bioquímicas entre várias espécies cocóides Gram +..... | 8 |
| Figura 2 – Constituintes de uma picadora utilizada na indústria alimentar..... | 19 |
| Figura 3 – Exemplo de picadora utilizada na indústria alimentar..... | 19 |
| Figura 4 – Exemplo de misturadora utilizada na indústria alimentar..... | 20 |
| Figura 5 – Exemplo de enchedora utilizada na indústria alimentar..... | 20 |
| Figura 6 – Fases do desenvolvimento de biofilme..... | 23 |
| Figura 7 – Esquema representativo da parede celular de uma bactéria Gram +..... | 25 |
| Figura 8 – Estrutura do PIA..... | 28 |
| Figura 9 – Modelo esquemático da síntese de PIA..... | 28 |
| Figura 10 – Identificação genética de <i>Staphylococcus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>S. xylosus</i> | 44 |
| Figura 11 – Identificação genética da espécie <i>S. equorum</i> | 44 |
| Figura 12 – Identificação genética da espécie <i>S. carnosus</i> | 44 |
| Figura 13 – Identificação genética da espécie <i>S. simulans</i> | 45 |
| Figura 14 – Identificação genética do gene <i>ica</i> | 51 |
| Figura 15 – Identificação genética do gene Bap..... | 52 |

Siglas e Acrónimos

| | |
|---------|--|
| BAP | <i>Biofilm associated protein</i> (Proteína Associada aos Biofilmes) |
| CNS | <i>Coagulase negative staphylococci</i> (Estafilococos coagulase negativos) |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| ICA | <i>Intercellular adhesion gene</i> (Gene de adesão intercelular) |
| ITU | Infecções do Tracto Urinário |
| LSBN | List of Bacterial Names with Standing Nomenclature (Lista de procariontes com nomenclatura universal) |
| MSCRAMM | <i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> (compostos à superfície bacteriana reconhecedores de moléculas de aderência a uma matriz) |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NAG | N-acetilglicosamina |
| NAM | Ácido N-acetilmurâmico |
| PIA | <i>Polyssacharide intercellular adhesine</i> (Adesina intercelular polissacarídea) |
| PCR | Polymerase chain reaction (Reacção em cadeia da polimerase) |
| Spp | Sub-espécie |

INTRODUÇÃO

Os objectivos deste estudo prendem-se com a identificação e caracterização de isolados de estafilococos coagulase negativos provenientes de diferentes fábricas de salsicharia e superfícies fabris, avaliando-se a sua capacidade para formar biofilmes, sendo estes relacionados muitas vezes com a microbiota iniciadora de fermentação em produtos cárneos fermentados.

Esta microbiota tecnológica confere propriedades organolépticas particulares aos enchidos fermentados. A necessidade da avaliação de capacidade de formação de biofilmes prende-se com o facto de se garantir a persistência da microflora tecnológica específica no ambiente fabril competitiva, que poderá até apresentar potencial antimicrobiano, contra agentes patogénicos. É por isso vantajoso seleccionar estirpes de estafilococos que tenham esta capacidade, permanecendo no ambiente fabril, e garantindo a sua persistência nos produtos cárneos fabricados, conferindo-lhes as características organolépticas específicas desejadas pelo consumidor.

Um biofilme é geralmente caracterizado por um conjunto de microrganismos irreversivelmente associado a uma superfície, podendo incluir materiais não celulares.

Os biofilmes têm-se tornado um importante objecto de estudo nos últimos anos, englobando cada vez mais áreas (desde superfícies hospitalares a superfícies fabris ou até sistemas de distribuição de águas), incluindo as relacionadas com a segurança dos alimentos. Os biofilmes podem comprometer a higiene de superfícies que contactam com matérias-primas e os equipamentos utilizados no processamento dos alimentos, uma vez que nele podem ser encontradas espécies responsáveis pela deterioração dos alimentos e também espécies patogénicas identificadas como potenciais perigos para o consumidor, sendo assim persistente a contaminação dos alimentos que contactam com estas superfícies.

Assim, a estrutura global da presente dissertação divide-se em: Revisão Bibliográfica, onde se faz uma discussão actual da temática escolhida focando pontos-chave como a utilização de *starters*, a caracterização das principais espécies encontradas no ambiente fabril e as metodologias para o estudo da formação de biofilmes por espécies do género *Staphylococcus*; Materiais e Métodos, onde se apresentam as metodologias aplicadas para o desenrolar do trabalho experimental, com o intuito de obter informações que permitam caracterizar as estirpes em estudo e atingir os objectivos propostos; apresentação dos Resultados obtidos na aplicação das metodologias utilizadas, com uma descrição dos dados obtidos e sua Discussão face a outros estudos publicados no âmbito deste tema em evidência das Conclusões resultantes da análise crítica.

I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Starters* na indústria alimentar

Os produtos de salsicharia, nomeadamente os enchidos, são uma das formas mais antigas de processamento dos alimentos, justificada pela necessidade de preservação dos alimentos pelo Homem, que intuitivamente terá recorrido a invólucros naturais, enchendo-os com carne picada (Esteves, 2005).

Os enchidos tradicionais são vistos como um produto cárneo de alto valor proteico, com boas qualidades gastronómicas, valor comercial baixo e simultaneamente com um bom poder de conservação e sanitariamente seguro, já assim os descreviam Sousa & Ribeiro (1983).

Nas últimas décadas o processo de fabrico de enchidos tem evoluído no sentido da industrialização, até porque existem grandes melhoramentos de forma a potenciar a eficácia das técnicas de processamento. No entanto, e tratando-se de um produto tradicional, todos os processos de elaboração, ainda que melhorados, devem manter as características organolépticas tradicionais do produto, uma vez que cada produto tradicional, visto que provém de determinada cultura e se baseia em diferentes sabores, apresenta características específicas de uma zona geográfica ou de um país.

Assim, as variações introduzidas no processo de elaboração tradicional relacionam-se principalmente com a introdução de mecanização, como a utilização de câmaras de secagem e/ou fumagem (com controlo de temperatura e humidade relativa) e a utilização de culturas de arranque (*starters*) para melhoramento da etapa de fermentação. Desta forma, torna-se possível a existência de uma produção contínua ao longo do ano, sem influência das condições climatéricas, e onde a maturação dos enchidos tradicionais se pode realizar em qualquer zona geográfica.

1.1 Definição e utilização de *starters*

A etapa de fermentação dos enchidos pode ocorrer naturalmente ou através da utilização de culturas de arranque, vulgarmente denominadas de *starters*. Existem numerosas vantagens na utilização de *starters* de forma a manter as características do produto, no sentido em que a inoculação de uma concentração fixa de bactérias nas mesmas condições ambientais irá permitir que as mesmas características de sabor sejam mantidas ao longo de todos os meses do ano, independentemente das temperaturas e humidade relativas nas diferentes épocas.

Um *starter*, segundo Hammes & Hertel (1995) pode ser considerado como uma preparação que contenha microrganismos vivos ou formas atenuadas e que promove uma actividade metabólica desejada no substrato a ser fermentado.

Um microrganismo, para que possa ser convenientemente considerado como *starter*, deve apresentar determinadas características: 1) não ser patogénico; 2) não produzir químicos tóxicos 3) ser de fácil manuseamento, armazenamento e transporte, 4) ser adequado ao período de fermentação do produto, 5) ter estabilidade genética, 6) ter algum grau de resistência a factores inibitórios presentes no produto fresco, 7) ter capacidade de desenvolver-se concomitantemente a outros *starters*, 8) ter reprodutibilidade entre diferentes culturas e 9) não deteriorar o produto durante a sua maturação e armazenamento (Robinson, 2008).

1.2 Principais *starters* utilizados no processamento alimentar

Os principais microrganismos utilizados como *starter* podem ser diversos, entre eles, bactérias do género *Staphylococcus*. Além das bactérias, sendo as bactérias ácido-lácticas e as estafilocócicas as mais utilizadas, podem utilizar-se também determinados bolores e leveduras. Na Tabela 1, encontram-se descritas as principais espécies utilizadas como *starters* na indústria alimentar.

Tabela 1 – Principais espécies microbianas que incluem *starters* utilizados na indústria alimentar (adaptado de Hammes & Hertel, 1995)

| | | |
|---|---|--|
| Bactérias | Ácido-Lácticas | <i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a ; <i>L. alimentarius</i> ^b , <i>L. casei</i> ^a , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. Pentosaceus</i> |
| | Actinobactérias | <i>Kocuria varians</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i> ^a |
| | Estafilococos | <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> , <i>S. equorum</i> ^b |
| | Halomonadáceas | <i>Halomonas elongata</i> ^b |
| | Enterobactérias | <i>Aeromonas sp.</i> |
| Bolores | <i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. Camemberti</i> | |
| Leveduras | <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i> | |
| ^a Utilizadas como culturas probióticas | | |
| ^b Utilizadas em estudos pré- mercado à escala industrial | | |

1.3 Bactérias estafilocócicas utilizadas como *starters*

Os *Staphylococcus* são um género muito importante e comum na utilização como *starter*, sendo os principais responsáveis pelo desenvolvimento da cor vermelha de produtos cárneos curados e cozidos. Destes últimos salienta-se o fiambre, uma vez que os *Staphylococcus* são ditos redutores de nitratos caracterizando-se pela capacidade de os reduzir em nitritos e em radicais nitrosilos os quais se conjugam com a mioglobina originando a forma nitroso-mioglobina, precursora do pigmento rosa que este produto cozido apresenta (Leroy *et al.*, 2006). Além desta propriedade, são vulgarmente considerados como

um dos grupos bacterianos com maior capacidade de conservação da qualidade organoléptica dos produtos cárneos, pelo desenvolvimento do sabor e do *flavor* específicos de cada produto cárneo, devido às suas capacidades lipolíticas e proteolíticas (Blaiotta *et al.*, 2004).

Eles apresentam-se também como os principais responsáveis na estabilização da cor, decomposição de peróxidos, proteólise, lipólise e na estabilização do aroma característico dos produtos cárneos (Garcia-Varona, Santos, Jaime & Rovira, 2000). Através das suas elevadas capacidades enzimáticas de nitrato-redutase e catalase, os estafilococos estão envolvidos na estabilização do produto, nomeadamente na prevenção e diminuição de cheiros não-característicos destes produtos. Salientam-se as espécies *S. xylosus* e *S. carnosus* como duas das principais espécies estafilocócicas utilizadas como culturas de arranque (*starters*), apesar de não ter sido ainda demonstrada a inactividade do *S. xylosus* em produzir enterotoxinas, facto determinante para a utilização desta espécie (Rodriguez, Nuñez, Córdoba, Bermúdez & Asensio, 1996).

Apesar de em fábricas de larga-escala se utilizarem culturas de arranque (*starters*), estas não são muito utilizadas em fábricas de menor escala, sendo que nestas últimas a presença destes microrganismos é vulgarmente considerada como “microbiota da casa”. Esta microbiota está presente nos produtos finais, mas a sua origem é pouco conhecida no que toca ao ambiente fabril, pouco se sabendo sobre o género *Staphylococcus* e a sua persistência no ambiente e superfícies fabris (Talon, Leroy & Lebert, 2007b; Leroy, Giammarinaro, Chacornac, Lebert & Talon, 2010).

De entre as bactérias comumente utilizadas como *starters*, as bactérias ácido-lácticas apresentam características acidificantes e antimicrobianas, sendo que as estafilocócicas prendem-se na evolução da cor e sabor dos enchidos (Talon *et al.*, 2007). Muitos autores acreditam que os microrganismos presentes na salsicharia tradicional provêm da matéria-prima e do ambiente fabril, assim como da própria manufactura (Mauriello, Casaburi, Blaiotta & Villani, 2004; Rantsiou *et al.*, 2005, citado por Talon *et al.*, 2007b).

Hammes & Hertel (1995) estudaram a optimização dos diferentes parâmetros para uma cultura de arranque mista, de forma a proporcionar uma maior viabilidade da cultura por um longo período de tempo, sendo que a eficiência para a fermentação de produtos de carne depende, primordialmente, das estirpes seleccionadas, assim como dos respectivos rácios e da co-existência de uma cultura mista. Para melhorar a qualidade e o sabor dos produtos de carne fermentados é muito importante aumentar a razão da concentração da proporção de *Micrococcus* (onde se incluem os CNS) para *Lactobacillus* de 3:1.

Num estudo efectuado por Leroy *et al.* (2010), identificou-se a população de *Staphylococcus* presente no ambiente fabril de nove fábricas de enchidos provenientes de França, onde se verificou que o *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. succinus*, *S. warneri* e o *S. carnosus* eram as espécies, por ordem decrescente, em maior número isoladas do ambiente

fabril. A prevalência do *S. equorum* em fábricas francesas já tinha também sido verificada por Morot-Bizot, Leroy & Talon (2006). No entanto, não foi encontrada em produtos de salsicharia espanhóis e gregos, tendo sido identificada também como principal espécie em produtos de salsicharia italiana (Drosinos *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Aquilanti *et al.*, 2007, citados por Leroy *et al.*, 2010).

Berdargué, Monteil, Montel & Talon (1993) relacionaram os tipos de *starters* com o sabor dos enchidos, sendo que Montel, Reitz, Talon, Berdargué & Roussett-Akrim (1996) demonstraram que diferentes espécies de estafilococos apresentavam potencialidade na manutenção do *flavor* característico de produtos de salsicharia tradicional quando utilizadas como *starters*.

A utilização de *S. carnosus* como *starter* demonstrou uma diminuição do tempo de maturação por mais de duas semanas em produtos tradicionais provenientes de Itália (Stahnke, Holck, Tensen, Nielsen & Zanardi, 2002).

Talon *et al.* (2007) desenvolveram uma cultura de arranque composta por uma mistura de *L. sakei*, *S. equorum* e *S. succinus*, que apresentou resultados positivos relativamente às condições higio-sanitárias dos produtos, demonstrando uma diminuição na quantidade de isolados de *L. monocytogenes* e *Enterococcus*. Apresentou também uma diminuição nos níveis de aminas biogénicas, oxidações lipídicas e óxidos colesterólicos, relativamente ao grupo controlo. Esta mistura *starter* demonstrou também boas capacidades de estabilização do sabor.

1.4 Persistência da microbiota no ambiente fabril

Nos enchidos fabricados de forma tradicional e artesanal no Alentejo, de acordo com o estudo de Elias, Fraqueza & Barreto (2006), não são utilizadas culturas de arranque na maturação dos enchidos. Desta forma, a microbiota da casa, existente tanto na própria carne como no ambiente fabril, irá funcionar como fermentadora do produto processado. Esta microbiota pré-existente pode interferir com o aroma, textura e propriedades nutricionais do produto final, assim como pode influenciar a própria segurança do produto (Bonomo, Ricciardi, Zotta, Sico & Saltzano, 2009).

Além da microbiota persistente tecnológica, que irá favorecer a fermentação na produção de enchidos tradicionais, podem fazer parte da microbiota do ambiente fabril também os microrganismos saprófitas e os patogénicos, sendo que estes podem surgir em produtos ou menos fermentados ou pouco maturados. Os microrganismos saprófitas são comumente denominados como microbiota deteriorativa, sendo geralmente relacionados a falhas na higiene e manufactura do produto (Planchon *et al.*, 2006, Talon *et al.*, 2007b).

Dentro das principais espécies constituintes da microbiota patogénica do ambiente fabril, podem destacar-se os *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria*

monocytogenes (Planchon *et al.*, 2006). O *S. aureus* pode multiplicar-se e produzir enterotoxinas patogénicas mesmo nas fases iniciais, como a maturação da carne enquanto a *E. coli* e a *Salmonella* têm maior importância em produtos pouco secos e pouco maturados. Já a *L. monocytogenes* tem sido detectada no produto final (Planchon *et al.*, 2006).

Num estudo realizado por Talon *et al.* (2007b), encontraram-se isolados de *Salmonella* em 4,8% dos produtos provenientes de diferentes fábricas de países mediterrânicos e Eslováquia, 6,7% de *Listeria monocytogenes* e 6,1% apresentavam *S. aureus*. De entre as superfícies e materiais mencionados, encontraram-se isolados de *S. aureus* na maquinaria e a *L. monocytogenes* foi isolada em maior número nas mesas e facas.

Já na Grécia, Drosinos *et al.* (2005) estudaram a microflora microbiana presente numa fábrica de processamento de enchidos, onde se averiguou que as bactérias ácido-lácticas eram dominantes na etapa final do processamento, tendo sido também avaliada a presença de Enterobactérias, *Pseudomonas*, leveduras, CNS e *Listeria monocytogenes*. Todas as contagens bacterianas efectuadas, à excepção das enterobactérias, diminuíram consideravelmente de número após a fermentação. Este facto pode dever-se à capacidade inibitória e estabilizadora das bactérias ácido-lácticas no produto final (Gonçalves, 2010).

Num estudo realizado por Esteves (2005) a alheiras provenientes da região de Trás-os-Montes, determinou-se que 70% das amostras analisadas apresentava pelo menos um microrganismo patogénico, tendo sido isolados *S. aureus*, *C. perfringens* e *Salmonella* spp. em 50%, 25% e 12,5% das amostras, respectivamente, sendo que algumas apresentavam quantidades suficientes capazes de causar toxi-infecções alimentares.

Como já referido anteriormente, a utilização de *starters*, além de proporcionar uma uniformidade do produto ao longo do ano, pode também contribuir para a diminuição da microbiota indesejável, uma vez que os *starters*, além de contribuírem para a qualidade organoléptica e estabilização do produto final, podem também apresentar capacidade inibitória de diferentes espécies patogénicas e deteriorativas do produto final.

2. Estafilococos Coagulase Negativos – identificação e caracterização

2.1 Género *Staphylococcus*

2.1.1 Considerações históricas

As bactérias do género *Staphylococcus* foram isoladas e descritas pela primeira vez por Robert Koch em 1878. Pasteur multiplicou-as em meio de cultivo líquido. Em 1880, o médico escocês Alexander Ogston adoptou o nome do género da palavra grega *staphylo* que significa cacho de uvas (Carvalho, 2010).

No ano de 1884, Rosenbach identificou duas espécies diferentes, denominando-as de *S. aureus* e *S. albus*. Nocard isolou o género *Staphylococcus* numa mastite ovina no ano de 1887, sendo que em 1890 foi sugerido por Guillebeau que este organismo era responsável por mastites em vacas. Desde 1980 que este género está incluído na “List of Bacterial Names with Standing Nomenclature” (LBSN - www.bacterio.net) como género *Staphylococcus*.

2.1.2 Caracterização do género *Staphylococcus*

Os estafilococos fazem parte da classe Bacilli, pertencente ao grande grupo descrito por Butler a partir da segunda edição, das bactérias Gram + com baixo teor molar. As bactérias estafilocócicas inserem-se na família Staphylococcaceae (Prescott, Harvey & Klein, 2008) que apresenta quatro géneros, dentro destes o género *Staphylococcus*. No entanto, Butler (1989) considera que os estafilococos estão inseridos na família das Micrococcaceae, sendo que esta engloba também o género *Micrococcus*. Apesar de serem considerados juntos e de ambos poderem ser isolados de material hospitalar e alimentos, estes dois géneros apresentam grandes diferenças entre eles. Tal como alguns estafilococos, os micrococos são inofensivos e bons indicadores de poluição, uma vez que o seu habitat é também o tecido epitelial de mamíferos, podendo ser utilizados como indicadores em piscinas e atmosferas poluídas, sendo resistentes às mais adversas condições (Favero, Drake & Randall, 1964; Mancinelli & Schulls, 1978). Os estafilococos apresentam geralmente metabolismo fermentativo e sobrevivem em atmosfera de anaerobiose, enquanto que os *Micrococcus* são oxidativos e aeróbios restritos. É de considerar que o termo *micrococcus* é ainda hoje vulgarmente utilizado para incluir estirpes que não sejam identificáveis, sendo por isso um género muito amplo e diversificado (Collins, 2004).

As bactérias do género *Staphylococcus* podem ser distinguidas também do género *Planococcus* pelo seu baixo teor molar (30 a 39 %mol), e da família Streptococcaceae pela composição da parede celular e a presença de citocromo.

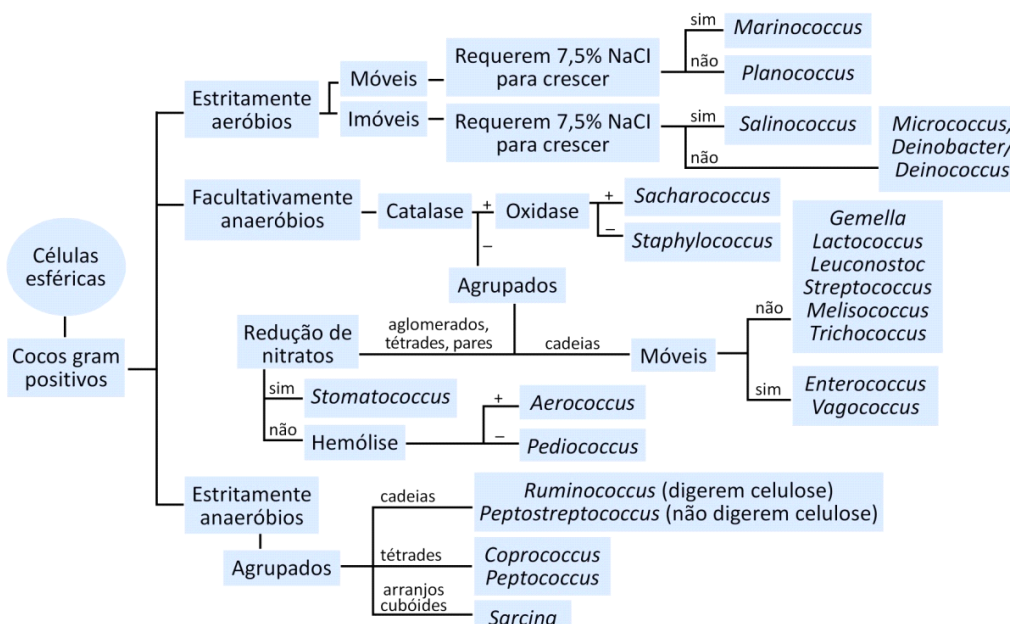
Assim, as bactérias do género *Staphylococcus* podem ser caracterizadas por bactérias de forma esférica (0,9 a 1,3 µm de diâmetro), Gram positivas, geralmente não móveis, podendo ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, com metabolismo respiratório e/ou fermentativo, geralmente catalase positivas e oxidase negativas. A sua fonte de energia baseia-se na utilização de aminoácidos ou carboidratos, sendo que todas as colónias crescem na presença de cloreto de sódio (a concentrações de 5% todas crescem, havendo algumas que crescem a concentrações de 10 a 15%). A parede celular das bactérias do género *Staphylococcus* apresenta, na maioria das vezes, ácidos teicóicos na sua constituição (Prescott *et al.*, 2008), e estas bactérias são geralmente identificadas a partir da sua capacidade de se associarem formando cachos irregulares.

As colónias são geralmente opacas, podendo ser de cor branca, creme, amarela ou laranja. O nitrato é geralmente reduzido a nitrito. Estas colónias não são susceptíveis à lise pela lisostafina nem pela lisozima, sendo que a sua temperatura ótima de crescimento é de 30-37°C. Os *Staphylococcus* estão associados principalmente com a pele e mucosas de vertebrados de sangue quente, mas podem ser isolados de produtos alimentares, pó e água.

A capacidade de produzir coagulase congrega as espécies em dois grupos: os estafilococos coagulase positivos (CPS), incluindo as espécies *S. aureus*; *S. hyicus*; *S. lutrae*; *S. intermedius*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi*, e os Estafilococos Coagulase Negativos (CNS), incluindo todas as demais espécies. A espécie *S. hyicus* apresenta grande variabilidade para a enzima coagulase, sendo frequentemente incluída como coagulase negativa. Num sentido geral, as bactérias coagulase positivas, por conterem a enzima coagulase causam coagulação plasmática.

Actualmente, segundo Euzéby (2011) estão identificadas 45 espécies e 24 sub-espécies (ssp) no género *Staphylococcus*. Na Figura 1, pode ver-se um esquema de identificação e diferenciação de bactérias cocóides Gram positivas.

Figura 1 – Esquema interpretativo das diferenças bioquímicas entre várias espécies cocóides Gram + [adaptado de ABIS – Bacterial Identification Software (<http://www.tgw1916.net/>)]



Legenda: + - positivo; - - negativo

Dentro do meio do processamento fabril, assim como nos seus produtos, as principais espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos existentes são o *S. equorum*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus* (Coton, Desmonts, Leroy, Coton & Janet, 2010; Leroy *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2011).

2.1.2.1 *S. equorum*

A espécie *S. equorum* foi proposta como espécie por Schleifer no ano de 1984, de acordo com Euzéby (2011). Até à data, conhecem-se duas sub-espécies desta espécie: spp *equorum*, citada pela primeira vez por Schleifer em 1985 e a spp *linens*, caracterizada por Robert Place tendo esta sido isolada de queijos franceses com fermentação natural (Carvalho, 2010).

A existência de *S. equorum* em produtos alimentares fermentados pode ter sido subestimada durante algum tempo uma vez que os métodos fenotípicos não permitiam uma distinção exacta desta espécie, podendo ser confundida com o *S. xylosus* (Blaiotta *et al.*, 2004), sendo que também pode estar presente em superfícies fabris destinadas ao processamento de alimentos fermentados, entre eles o queijo e salsicharia (Leroy *et al.*, 2009).

Esta espécie apresenta-se como cocos de 0,8 a 1, 5 µm de diâmetro formadores de colónias após 48 horas de incubação. As colónias são geralmente brancas e opacas, com tamanho variado entre 1 a 6mm, podendo ser ou não hemolíticas. Crescem a 37°C, sendo que a sua temperatura óptima de crescimento é dos 30°C aos 32°C. Estas bactérias são também caracterizadas como possíveis diminutoras do crescimento de *Listeria spp*, ao serem utilizadas como *starters*, não apresentando indícios de virulência (Place, Hiestad, Gallman & Tenber, 2003).

São ambas sub-espécies redutoras de nitratos e produtoras de ácido pela frutose, D-glucose e D-Manose. A spp *equorum* pode distinguir-se da spp *linens* pelo facto de que a primeira é fermentadora do manital, enquanto que a segunda não. Estas sub-espécies são, no entanto, difíceis de distinguir mediante ensaios bioquímicos, sendo que podem ser distinguidas através de técnicas de biologia molecular (Carvalho, 2010; Euzéby, 2011).

As espécies de *S. equorum* representam 28,5% de isolados de *Staphylococcus* em queijaria, salsicharia, ambientes fabris e amostras clínicas provenientes de França (Coton, 2010), 10 a 40% de amostras provenientes de salsicharia do sul de Itália (Blaiotta *et al.*, 2004) e é considerada uma das espécies com maior capacidade para persistir em ambientes fabris, em alimentos processados, assim como em alimentos fermentados.

O facto de ser uma espécie com enorme adaptabilidade e persistência em ambientes alimentares, mesmo naqueles onde não é utilizado como *starter*, é considerada um bom modelo de medida de contaminação cruzada entre as superfícies fabris e os produtos lá

processados. Desta forma, deve considerar-se também como factor importante a capacidade desta espécie em produzir biofilme, de forma a poder determinar-se se esta característica deve ser considerada como vantajosa ou não, como forma de evitar colonizações de bactérias patogénicas em superfícies (Leroy *et al.*, 2009).

2.1.2.2 *S. xylosus*

O *S. xylosus* foi descrito pela primeira vez por Kloos & Schleifer em 1975, caracterizando esta bactéria pela sua forma redonda (*coccus*) com diâmetro entre 0,8 e 1,2 µm, que forma de colónias de 5 a 10 mm de diâmetro com uma coloração variável, podendo ser desde laranja-amarelado a amarelo-acinzentado. De acordo com Schleifer *et al.* (1975, citado por Carvalho, 2010), algumas estirpes produzem pigmento apenas em temperaturas inferiores a 20°C, de 35°C a 37°C não apresentam coloração, havendo no entanto cerca de 20% das estirpes que não apresentam coloração a qualquer temperatura, dos 15°C aos 40°C. Em estudos realizados verificou-se que estirpes de *S. xylosus* crescem em meios de cultura com concentração acima de 10% de NaCl, sendo que 48% não crescem em concentrações de NaCl acima dos 15% (Kloos & Schleiffer, 1986).

Esta espécie faz parte da microbiota da pele de mamíferos, sendo frequentemente isolada do leite, carne, queijos e produtos de salsicharia (Talon, Leroy-Setrin & Fadda, 2002).

Após fermentação da glucose, os *S. xylosus* produzem L-Lactato ainda que em pequenas quantidades. Algumas estirpes de *S. xylosus* podem produzir elevadas quantidades de manitol intracelular, comparativamente a outras espécies estafilocócicas (Kloos & Schleiffer, 1986).

Esta espécie é frequentemente utilizada como *starter* em combinação com bactérias ácido-lácticas em chouriços e queijos, uma vez que 80% destas estirpes têm a enzima nitrato-reductase, originando uma coloração desejada em produtos cárneos e apresentam também uma capacidade anti-oxidante, bastante importante para evitar a rancificação (Barrière *et al.*, 2001).

A maioria destas bactérias (80%) produz ácido a partir de variados hidratos de carbono, entre eles a galactose, arabinose, lactose, trealose ou turanose.

Ainda que 40 a 70% destas estirpes evidencie actividade lipolítica, muitas não apresentam actividade proteolítica (Kloos & Schleifer, 1986).

Após estudos realizados em laboratório, determinou-se que esta espécie tem também capacidade de produzir substâncias inibidoras do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e de *S. aureus* (Villani *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 2006), o que confere um aumento da vida útil dos enchidos quando o *S. xylosus* é utilizado como *starter*.

Por ser frequentemente isolada de superfícies fabris de produtos de salsicharia, a presença desta espécie de *Staphylococcus* pode estar relacionada com a sua capacidade formadora

de biofilmes, estando envolvida nos processos de colonização de superfícies bióticas ou abióticas (Planchon *et al.*, 2006).

2.1.2.3 *S. saprophyticus*

Esta espécie de *Staphylococcus* tem forma característica de cocos com diâmetro de 0,8 a 1,2 μm , formando colônias com 4 a 9mm com pigmentação amarelada que aumenta de intensidade com o tempo. Existem no entanto algumas estirpes que não formam pigmento algum.

Existem duas sub-espécies do *S. saprophyticus*: Spp. *saprophyticus* e spp. *bovis*, sendo que esta última tem capacidades redutoras de nitrato, produz pirrolidonil arilamidase em vez de acetilmetilcarbinol e consegue fermentar a galactose e a ribose. No entanto, não apresenta capacidade de hidrolisar esculina e amido, ao contrário do *S. saprophyticus saprophyticus* (Hajek *et al.*, 1996).

O ácido produzido por estas bactérias pode ser proveniente da frutose, glucose, glicerol, maltose, manitol, ribose, treatose e N-acetilglicosamina em condições de aerobiose e da glucose em condições de anaerobiose.

A maior parte das estirpes estudadas por Kloos & Schleifer (1975) apresentavam a capacidade de produzir ácido láctico, ainda que em pequenas quantidades.

As bactérias desta espécie têm fraco crescimento a 10°C, sendo a sua temperatura óptima de 28°C a 35°C, apresentam capacidade de desenvolvimento em NaCl a 10% mas fraco desenvolvimento em NaCl a 12% (Kloos & Schleiffer, 1986).

Nos Estados Unidos, estas bactérias são as segundas principais responsáveis de infecções do tracto urinário (ITU) feminino, especialmente em jovens, sendo que ocorrem em 25% a 44% dos casos, percentagem apenas ultrapassada pelas ITU com *E. coli*. Os *S. saprophyticus* encontram-se primordialmente no tracto gastrointestinal e na vagina e fazem parte do grupo de CNS resistente à novobiocina. Recentemente, foi descrito no Japão casos de resistência à metilicina, sendo por isso uma espécie-alvo de muitos estudos actuais (Higashide *et al.*, 2008).

Características como o tamanho da célula, a capacidade de redução de nitratos, a produção de urease e ácido a partir da ribose, a impossibilidade de hidrolisar a esculina e a capacidade de produzir ácido a partir da celobiose, rafinose e xilose são características úteis à identificação da espécie, principalmente no que toca à distinção entre outras espécies estafilocócicas, como o *S. equorum* e o *S. xylosus* (Anexo 1).

Existem algumas estirpes de *S. saprophyticus* que não produzem poli-N-acetilglucosamina (PNAG), um dos responsáveis pela formação de biofilmes, nem ácido poliglutâmico, um polímero aniónico descrito como factor de virulência de algumas espécies de *Staphylococcus*. Desta forma, espera-se que possa não haver capacidade desta espécie em formar biofilmes, ainda que esta seja uma espécie causadora de infecções e contenha uma

cápsula constituída por diversos polissacarídeos capsulares, referida por Park (2010) como sendo fenotipicamente semelhante à que constitui a cápsula do *S. aureus*.

3. Processo de fabrico de enchidos

3.1 Considerações históricas e gerais

No Paleolítico o Homem alimentava-se do que caçava ou do que recolhia directamente na Natureza, as fontes de alimentos naturais eram então suficientes para cobrir as necessidades da população (Bellwood, 2001).

Com o progressivo aumento da densidade populacional e a consequente escassez de recursos, o Homem teve necessidade de iniciar o cultivo da terra e a criação de animais. Após ter aprendido a produzir os alimentos frescos que recolhia directamente da natureza, o Homem passou a ser capaz de os conservar, passando assim a superar períodos de escassez causados pela sazonalidade das produções, más colheitas e catástrofes naturais. Desta forma, além de conseguir garantir a sua sobrevivência, criou vários métodos para a conservação dos alimentos de origem animal, com a dupla finalidade de os disponibilizar em alturas de escassez e facilitar a sua distribuição; passou, assim, a produzir-se carne e peixe secos, salgados, fermentados ou fumados (Hulse, 2004).

3.2 Fases do processamento de enchidos

O processo de produção de enchidos compreende 6 diferentes fases: 1) selecção da carne e gordura, 2) miga, 3) preparação da massa e condimentação, 4) maturação, 5) enchimento e 6) cura, secagem e fumagem (Muguerza *et al.*, 2004), que serão descritos em seguida.

Ainda que cada produção possa apresentar diferentes matérias-primas e até modos de elaboração, a produção de enchidos, segundo Kramlich (1976), baseia-se em dois pilares fundamentais:

- Estabilização da Matéria-Prima

Nesta fase a carne deve transformar-se num produto estável à temperatura ambiente, evitando-se o desenvolvimento de alterações microbianas que conduzam à sua putrefacção. Isto é conseguido nas chamadas etapas frias e que correspondem às primeiras fases de elaboração dos enchidos: 1) selecção da carne e gordura, 2) miga e 3) preparação da massa e condimentação.

- Desenvolvimento das características sensoriais

A partir da modificação dos componentes dos enchidos, proteínas e lípidos, alcançam-se as características sensoriais que caracterizam estes produtos. Produzem-se reacções químicas e enzimáticas que conduzem à formação de compostos sápidos e aromáticos e que conferem a qualidade organoléptica característica dos enchidos.

Estas reacções ocorrem na segunda fase de produção, correspondentes à 4) maturação, 5) enchimento e 6) cura, secagem e fumagem.

3.2.1 Fase de escolha

Na fase de escolha ocorre a selecção das carnes e gorduras específicas para cada tipo de enchido. Este critério define que as carnes devem ser firmes, com elevado poder tampão e que tenham uma boa capacidade de retenção de água. O valor de pH desta deve ser entre 5,6 e 6,0 (Pezacki, 1979). A escolha das carnes para o fabrico de enchidos deve permitir a obtenção de uma massa de composição equilibrada entre as fracções muscular e lipídica, de forma a cumprir os mínimos e máximos indicados pelas Normas Portuguesas. Um baixo teor em gordura reflecte-se, por exemplo, na qualidade da maior parte dos enchidos, que se tornam secos e quebradiços, prejudicando a sua aparência, textura e “flavor” (Sousa e Ribeiro, 1983). A gordura deve, portanto, ser firme, utilizando-se geralmente o toucinho dorsal, visto que apresenta um baixo teor de ácidos gordos insaturados, sendo que estes aumentam a ocorrência de oxidações e exsudações, levando ao característico sabor a “ranço” (Elias *et al.*, 2006). O chouriço tradicional alentejano é um produto que é frequentemente fabricado e composto na sua massa por um rácio de carne/gordura de 70/30 ou nalguns casos de 80/20 (Elias *et al.*, 2006).

3.2.2 Fase de miga

A fase da miga tem por objectivo reduzir os pedaços de carne, de gordura ou vísceras, a fragmentos mais pequenos, cujas dimensões variam em função do tipo de enchido (Sousa e Ribeiro, 1983). Além de reduzir a carne e gordura a fragmentos com dimensões adequadas, a miga é também importante no sentido em que a redução de tamanho se relaciona directamente com a eliminação de água, sendo mais lenta nos fragmentos de maior dimensão (Elias *et al.*, 2006). Esta fase de corte geralmente tem a ajuda de processos mecânicos, nomeadamente cortadoras e picadoras.

3.2.3 Fase de preparação da massa e condimentação

Para a preparação da massa e condimentação, a mistura carne/gordura já devidamente migada é colocada em recipientes nos quais são adicionados outros ingredientes, alguns essenciais, outros facultativos, em função da natureza do enchido: água, vinho ou vinagre, arroz, pão, farinha, sangue, salsa, pimentão, alho, cominhos, cravinho, canela, erva-doce. Os condimentos tradicionalmente mais utilizados são o alho, a massa de pimentão e o colorau. Estas substâncias são de extrema importância, uma vez que conferem características organolépticas desejáveis e apreciáveis, contribuindo para a tipicidade do produto.

Nesta fase pode também ocorrer a adição de substâncias com acção de cura. Esta adição é importante para que se possa alcançar a cor característica dos enchidos, podendo consistir de três diferentes procedimentos: cura seca, cura húmida/salmoura e injeção de salmoura no enchido (Sousa e Ribeiro, 1983). Além da adição de sal (NaCl), pode adicionar-se pequenas porções de Nitrito de Sódio (NaNO_2), aquando do processo de salmoura (25% sal e <200ppm nitrito). O nitrito de sódio é responsável por reagir com mioglobulina da carne, de forma a formar uma coloração rosada estável.

3.2.4 Fase de maturação

Após o processo de preparação da massa e condimentação, o preparado será submetido a um período de maturação.

Nesta fase pretende-se intensificar o aroma da chamada cura, dos ingredientes adicionados e estabilizar a cor do curado destes produtos. Assim, a mistura é submetida a um período de repouso.

O produto sofre uma maturação láctica, e paralelamente, devido à entrada de sal nos fragmentos de carne, haverá também uma saída de água e proteínas miofibrilhares, que quando extraídas tornam as superfícies dos fragmentos mais viscosas, tendo assim um papel determinante na ligação da massa. É a maturação láctica resultante da multiplicação da microflora láctica com metabolização do glicogénio que dá origem ao sabor ácido dos produtos. A diminuição de pH torna a matriz hostil ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Poderá ainda afectar a actividade da água ao originar uma maior 'retenção' de água pelas proteínas, resultando numa menor quantidade de água disponível e livre para os processos metabólicos.

3.2.5 Fase de enchimento

A fase de enchimento consiste em introduzir a massa cárnea no invólucro que lhe é destinado. A tripa natural, geralmente utilizada, deve estar em boas condições higiénicas e íntegra, de forma a conseguir suportar as pressões necessárias à obtenção de um enchimento compacto, proporcionando à massa coesão, forma e dimensão e protegendo-a assim de influências externas, entre elas, contaminações bacterianas. Para este procedimento, utilizam-se geralmente enchedoras de *inox*. O enchimento realiza-se sob pressão de modo a que a massa preencha a tripa e, ao mesmo tempo seja possível a dilatação máxima da tripa, compatível com a sua elasticidade. Caso contrário, ficam espaços cheios de ar que prejudicam a qualidade dos produtos favorecendo a rancificação e a decomposição (Janeiro, 1948).

3.2.6 Fase de cura

A fase de cura no processo generalista do fabrico de enchidos em Portugal está geralmente associada à fumagem e posterior secagem, havendo no entanto outros processos que podem utilizar-se, dependendo do tipo de enchido (Prandl *et al.*, 1994), nomeadamente os processos de escaldão, associado à produção de morcelas de arroz e alheiras.

A função desta etapa de processamento é provocar a desidratação e a intensificação dos fenómenos bioquímicos de lipólise e de proteólise, fenómenos estes muito importantes uma vez que vão influenciar de forma directa a textura, o aroma e o sabor dos enchidos. As temperaturas aplicadas nesta etapa devem ser consideravelmente superiores às anteriores, de forma que o enchido de carne adquira estabilidade, graças à acidificação resultante da fermentação (que se processa através da desidratação, onde se dá também um aumento do teor em sais e decréscimo da actividade da água) e da acção do fumo.

A fumagem consiste assim na colocação dos produtos em câmaras, podendo ser estufas ou fumeiros, ou suspensos numa lareira, de modo a ficarem regularmente expostos ao fumo resultante da combustão lenta de madeiras duras como o azinho, faia, sobro, amieiro, sob a forma de toros, aparas, conforme se pretende fumo quente ou frio (Sousa e Ribeiro, 1983). Em Portugal, geralmente utiliza-se a fumagem como método de tratamento e a madeira mais utilizada no fumeiro é a lenha de azinho, sendo que a fumagem atinge temperaturas variadas entre os 10°C e os 40°C (Elias *et al.*, 2006).

A temperatura de fumagem a que os enchidos são submetidos varia em função da actividade do fogo e da distância a que dele se situam, sendo que o processo artesanal se caracteriza por longos períodos de fumagem pouco intensa, conjugando o factor tempo com a temperatura. Já na etapa de secagem, as temperaturas podem variar entre os 10°C e os 20°C, podendo ser feita em atmosferas de ambiente controlado, em salas à temperatura ambiente ou até no próprio fumeiro. A duração do período de cura propriamente dito (incluindo as etapas de fumeiro e secagem) é variável, dependendo do tipo de fumeiro e secagem utilizados (Sousa e Ribeiro, 1983).

3.2.7 Fase de embalamento

Na maioria dos casos caracterizados em Portugal, utiliza-se o embalamento a vácuo como forma de embalamento do enchido, sendo considerado um método bastante eficaz. Os processos tecnológicos de refrigeração e embalagem a vácuo têm feito com que a defumação tenha menor importância com a finalidade de conservação (Prandl *et al.*, 1994). O embalamento a vácuo traz vantagens tanto económicas como higiénicas, uma vez que diminui a perda de peso e inibe o crescimento bacteriano.

3.3 Requisitos importantes para uma fábrica de processamento de enchidos

A dinâmica de uma boa planta da fábrica para a produção de enchidos é extremamente importante e complexa, independentemente do seu tamanho. No entanto, é impossível determinar-se um processo uniforme constante em todos os tipos de produção, uma vez que existem alargadas variações geofísicas, económicas, sociais, de consumo e até da origem da própria carne (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1985 [FAO]), devendo este último factor ser largamente considerado, especialmente em regiões menos desenvolvidas, onde as condições de transporte, armazenamento e até processamento podem ser menos favoráveis.

3.3.1 Considerações sobre o *layout* das salas de uma fábrica de enchidos

Ainda que dependa primariamente do tamanho da planta, da quantidade produzida e do género de enchido a ser produzido, qualquer fábrica de enchidos deve considerar certos princípios comuns. Assim, independentemente do tamanho útil de cada fábrica, esta deve seguir uma linha lógica de produção, desde a recepção da matéria-prima e seu armazenamento até todas as etapas de processamento, já descritas anteriormente.

Os principais princípios tanto tecnológicos como higiénicos para a produção de enchidos prendem-se essencialmente pela rapidez e facilidade com que cada etapa se processa, devendo ser o mais curtas possível, tanto em tempo quanto em espaço entre processos, cumprindo os requisitos espaciais mínimos de forma que não ocorram contaminações cruzadas.

Assim, uma planta que confira a entrada da carne numa zona, percorrendo um sentido único no processamento, até à saída do alimento processado na zona oposta à de entrada, é uma boa tática para que se evitem contaminações e cruzamento até dos trabalhadores nos espaços anteriores. Desta forma, a FAO (1985) aconselha a que o edifício esteja construído e organizado para que a carne e produtos se movam sempre em uma única direcção, evitando o risco de contaminações, sendo que os operadores devem estar posicionados ao longo das mesas e máquinas de processamento e movimentar o produto na direcção necessária.

Em termos gerais, uma fábrica de enchidos deve ter o seu início pela secção de recepção e zona de frio. Quando a carne chega, em camiões especializados, deve entrar na fábrica por tapetes ou rampas de descarga, em que a entrada deve ser directa e desobstruída até à zona de frio ou à sala de desmancha. Este processo deve ser o mais rápido possível e depender o mínimo possível de manipulações pelos trabalhadores. Quando possível, a entrada na fábrica de outros produtos, como as especiarias, deve ser feita separadamente, de forma a garantir as condições básicas de higiene. Esta zona deve ser preferencialmente refrigerada, e a zona de frio no armazenamento deve manter-se entre os 0°C e os 4°C.

A zona de frio e a zona de corte e desmancha devem encontrar-se conectadas ou serem de fácil acesso entre elas. A zona de corte e desmancha deve também ser refrigerada (máximo 12°C) e conter mesas de corte, geralmente de aço inoxidável com placas de corte móveis de forma a serem lavadas e desinfectadas fácil e separadamente. A sua disposição deve ser intuitiva e de fácil acesso aos trabalhadores, assim como de fácil limpeza e desinfecção. A fase de desossa, quando existente, deve ser a primeira a ser considerada (FAO, 1985).

Após a desmancha e o corte da carne, a mistura com outros ingredientes deve ser feita num local separadamente. A massa cárnea é colocada na tripa, sendo os produtos movidos para o fumeiro. Posteriormente, deve providenciar-se um local onde se faça o embalamento, pesagem, etiquetagem do produto para que possa ser enviado para distribuição.

3.3.2 Origem dos materiais de construção, pisos e paredes

Todo o espaço destinado ao processamento de alimentos deve ser prático, conciso e deve ter em conta as condições económicas relativas ao capital investido e ao custo das operações efectuadas no espaço.

Como será de esperar, a estrutura física da fábrica deve ser compatível com as temperaturas existentes fora do espaço e as requeridas dentro de cada sala de processamento. Como tal, podem utilizar-se vários materiais, entre eles o tijolo, pedra, pré-fabricados de alumínio e até o betão armado. Materiais como madeira, devido à sua porosidade, não são aconselháveis para o efeito.

O piso deve ser anti-derrapante, liso e impermeável, para que possa ser facilmente limpo e não-absorvente. Se possível, devem evitar-se cantos terminados em ponta nas junções das paredes interiores, sendo que estas devem ter características de impenetrabilidade, lisas e ser revestidas por material não-absorvente. Para o efeito, deverão ser utilizados materiais impermeáveis, não absorventes, laváveis e não tóxicos (Regulamento CE 852/2004).

As paredes de qualquer sala da fábrica devem ser lisas, impermeáveis e revestidas por material não-absorvente. Assim, será de esperar que as paredes da sala da enchedora apresentem estas características. Uma forma de obter estas características, bastante utilizada em fábricas Portuguesas, é o revestimento das paredes por mosaico de monocozimento, sendo que este é composto por material de fácil lavagem, pouca impenetrabilidade e ao ser branco, é possível a visibilidade a olho nu de pequenos pedaços de produto que possam ser projectados aquando do processamento.

Os tectos, em especial nas salas onde se efectuam operações com humidade controlada ou onde haja manipulação livre de água, devem ser lisos e de material não absorvente, para que não haja acumulações de humidade nestes, podendo levar a contaminações microbiológicas e fúngicas.

Ainda que uma ventilação natural seja sempre aconselhada (FAO, 1985), por vezes a ventilação artificial é a solução mais apropriada, principalmente em localidades onde as

temperaturas exteriores sejam muito discrepantes das necessárias no interior das salas de processamento.

As linhas de escoamento de efluentes devem ser rápidas e ter um diâmetro de pelo menos 10cm, devendo incluir redes ou mecanismos de retenção de gordura incluídos no sistema de escoamento.

3.3.3 Saneamento e Higiene

Apesar de ser importante utilizar bons materiais, não absorventes, com características adequadas ao processamento de carnes, na estrutura física da fábrica, o saneamento consiste num passo essencial para que não haja contaminações ou proliferações bacterianas em todas as fases do processo. Assim, a manutenção e higiene das salas e de todos os equipamentos é um factor extremamente importante para a eficiência da produção e qualidade do produto final (Varnam, 1995).

A fábrica deve conter lavatórios e duches, se possível, para os trabalhadores de ambos os sexos com água quente e fria, devendo estas ser mantidas limpas. Além dos balneários, deve existir uma zona de vestuário e uma zona de comida.

Devem existir cabines de limpeza e esterilização do material individual de cada trabalhador, onde se coloca o equipamento que será lavado com soluções de limpeza e posteriormente passado por água quente antes da utilização deste (FAO, 1985).

Um bom controlo de pragas é essencial para evitar a permanência de insectos e roedores nas salas, devendo adaptar-se redes em todas as janelas e entradas de ar.

A limpeza diária do estabelecimento é uma boa prática de higiene, sendo aconselhada a utilização de água quente com pressão e mecanismos físicos (escovas, vassouras, etc...) para uma boa limpeza, especialmente nas áreas de corte e de enchimento. Os detergentes também contribuem para uma boa limpeza, uma vez que provocam a emulsão das gorduras e dissolvem as proteínas (Varnam, 1995).

3.4 Requisitos de construção, funcionamento e higiene da maquinaria fabril

Numa fábrica de enchidos, além de uma disposição pensada dos materiais e trabalhadores e de uma atmosfera limpa e preferencialmente fresca, existem outros parâmetros a ter em conta de forma a evitar a proliferação bacteriana com contaminação do produto, como a falta de higienização da maquinaria e das superfícies de trabalho. De forma a evitar contaminações cruzadas, existe uma norma internacional que considera que as máquinas e os utensílios de qualquer fábrica alimentar devem ser construídos por aço inoxidável austenítico, geralmente o do tipo 304 com polimento, que pode ser soldado para aplicação em indústrias alimentícias e de bebidas, nas quais, além da resistência à corrosão, sejam minimizadas as possibilidades de contaminação e deterioração dos produtos e haja facilidade de limpeza (Norma ASTM A-270, 2010). A principal diferença entre os graus de

aço disponíveis no mercado é sua composição relativa de ferro, cromo e níquel e a baixa percentagem de carbono em todos eles. De entre os tipos de aços inoxidáveis disponíveis para fabrico de equipamento referenciados pela Norma ASTM A-270, os mais utilizados são os do chamado grupo 18 - 8, ou seja, apresentam na sua composição 18% de cromo para 8% de níquel. Assim, qualquer material metálico que exista numa empresa de ordem alimentar deve ser feito de lâminas de aço inoxidável, com um acabamento especializado em evitar a aglomeração bacteriana nos materiais (Araújo *et al.*, 2003).

Relativamente aos polímeros plásticos que são geralmente utilizados na indústria de alimentos, estes apresentam diversas propriedades, dependendo da matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Podem, no entanto, ser agrupados em duas grandes categorias: termo-plásticos e termo-estáveis. Os termo-plásticos mais utilizados em indústrias de alimentos são o polietileno, polipropileno, poli-cloreto de vinil (PVC) e o acrílico. No grupo dos termo-estáveis podem incluir-se o poliéster, resinas, poliuretanos, entre outros.

De seguida, irá descrever-se de forma sucinta e breve as características inerentes às máquinas utilizadas no processo de fabricação de enchidos.

3.4.1 Picadora

Em relação à picadora de carne, a FAO (1985) recomenda que esta nunca seja posta a funcionar quando vazia, visto ser constituída por lâminas e um prato (Figura 2), que contém uma boca amovível com diferentes diâmetros, que é a linha de



Figura 2 – Constituintes de uma picadora utilizada na indústria alimentar

saída da carne, e estes são facilmente quebrados quando funcionam no vazio. Esta máquina geralmente é composta por um cilindro vertical onde se coloca a carne

em pedaços, que posteriormente é empurrada (criando assim um gradiente



Figura 3 – Exemplo de picadora utilizada na indústria alimentar

de pressão) para uma zona de disposição horizontal onde está contida a lâmina (que apresenta uma forma helicoidal, sendo rotativa) e que termina num prato perfurado de diferentes diâmetros (podendo assim escolher-se o tamanho do picado final), podendo ser de 1 a 13 mm (FAO, 1985) (Figura 3).

3.4.2 Misturadora



Figura 4 – Exemplo de misturadora utilizada na indústria alimentar

A misturadora tem como objectivo misturar a carne e a gordura com as especiarias necessárias à emulsão final do enchido em questão. Pode haver vantagem em fazer-se esta mistura em vácuo, especialmente em enchidos que não seja adicionada água. Esta máquina é constituída por um contentor rectangular de pontas rombas (geralmente apresenta a parte inferior em redondo) com duas pás que misturam a massa final em sentido horizontal de forma a criar uma mistura homogénea.

O seu esvaziamento geralmente faz-se virando o contentor num ângulo de 90° (FAO, 1985), daí que seja importante uma boa lavagem e desinfecção desta

maquinaria, uma vez que não apresenta as melhores dinâmicas para uma limpeza e remoção de restos totais (Figura 4).

3.4.3 Enchedora



Figura 5 – Exemplo de enchedora utilizada na indústria alimentar

A enchedora é uma máquina que serve ao enchimento da massa final na tripa. Para tal, apresenta uma boca amovível (que pode ser plástica) para o encaixe da tripa. Existem dois tipos principais de enchedoras, dependendo do tamanho da fábrica e da quantidade de enchidos produzida (uma vez que o investimento entre uma e outra enchedoras é bastante diferente). As enchedoras cilíndricas verticais são as mais utilizadas em pequenas fábricas, sendo as mais comuns, consistindo num mecanismo hidráulico, automatizado ou manual, em que quanto maior o diâmetro da enchedora, menor o diâmetro

do enchimento. A maior desvantagem desta enchedora (com um mecanismo mais rudimentar) prende-se na descontinuidade do enchimento, situação que não

acontece no segundo tipo de enchedoras, maiores e mais industriais, que contém uma pequena bomba hidráulica e um contentor onde pode colocar-se mistura de carne a qualquer altura, sendo desta forma um processo contínuo e mais automatizado (Figura 5).

4. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes bacterianos

4.1 Biofilmes

Desde há muito que existem estruturas formadas e organizadas pelas células bacterianas em suspensões aquosas ou aderentes a superfícies de forma que as suas necessidades básicas sejam cumpridas, num sistema de comunidade que lhes permite sobreviver e obter os metabolismos necessários ao crescimento e multiplicação. Na microbiologia tradicional, os conjuntos de aglomerados bacterianos eram vulgarmente chamados de suspensões planctónicas, sendo que estas em teoria se encontrariam em suspensão, livres, ainda que aglomeradas em conjunto (Lucchesi, 2006). Após estudos exaustivos e correspondentes avaliações, identificações e caracterizações, pode determinar-se que grande parte destes aglomerados em suspensão tinham também a capacidade em aderir a superfícies, sendo que estes estudos se têm prolongado ao longo das duas últimas décadas. Grande parte da determinação desta diferença prende-se à evolução das técnicas de microscopia, permitindo verificar que grande parte dos microrganismos se encontra fixado às superfícies e não em suspensão como se pensava anteriormente (Casalinni, 2008).

4.1.1 Considerações Históricas

As primeiras observações de biofilmes foram efectuadas por Antoine van Leuwenhoek, que ao estudar amostras de dentes ao microscópio, visualizou um elevado número de células agregadas em maior número do que aquelas que se encontravam em suspensão. Contudo, já desde Robert Koch que se considerava a capacidade de formação de aglomerados e comunidades complexas pelas bactérias, de forma a haver uma maior subsistência por parte destas (Casalini, 2008). Apenas mais tarde, em 1943, surgiu a primeira publicação que descrevia os biofilmes, onde Zobell determinou a existência de adesão de bactérias marinhas em cascos de navios, estudando-as também em outras superfícies, como o vidro, o metal e o plástico submersos (Lucchesi, 2006).

Desde as primeiras verificações da capacidade de adesão dos aglomerados de bactérias até à descrição do termo Biofilme, que o mundo científico tem estudado este tema mais profundamente, numa tentativa de determinar os benefícios ou malefícios da existência destes aglomerados, assim como os seus mecanismos fisiológicos. Uma vez que se trata de um aglomerado simbiótico com algum grau de parceria entre as bactérias (Casalini, 2008), é também considerado um indicador de adaptação bacteriana no sentido de aumentar a sua capacidade de sobrevivência, por exemplo através de novas resistências a antibióticos.

4.1.2 Definição de biofilme

Segundo McFeters *et al.* (1984), um biofilme pode caracterizar-se como um conjunto de microrganismos e outros materiais extra-celulares associados a um substrato. Já em 1989,

Characklis definiu um biofilme como um conjunto de células imóveis num substrato, podendo estar embutidas numa matriz orgânica produzida por microrganismos.

Um biofilme, hoje em dia, pode ser caracterizado como um conjunto de microrganismos associados entre si, aderentes a superfícies bióticas ou abióticas e que podem conter produtos extra-celulares na sua composição (Carpentier, 1993; Percival, 1997; Donlan, 2002; Seo, 2008).

4.2 Estrutura e composição do biofilme

Grande parte da composição do biofilme – que pode chegar até aos 97% - é composta por água. A água pode ser unicamente provinda das células microbianas ou então existir como solvente, sendo a sua viscosidade determinada pela concentração dos solutos dissolvidos. Além da água e das células microbianas envolvidas no processo, a matriz é constituída por polímeros secretados pelas células, nutrientes e metabolitos absorvidos, produtos da lise celular e até pequenas partículas que constituem o espaço envolvente à zona de adesão. É também constituído por macromoléculas, como proteínas, DNA, RNA e polissacarídeos (Sutherland, 2001). A Tabela 2 apresenta as percentagens médias dos constituintes que integram a composição do biofilme.

| Composto | % na matriz |
|--|---|
| Água | Até 97% |
| Células microbianas | 2 – 5 % |
| Polissacarídeos | 1 – 2 % |
| Proteínas (extracelulares e resultantes da lise) | < 1 – 2 % (muitas incluem enzimas) |
| DNA e RNA | < 1 – 2 % (provenientes de células que sofreram lise) |
| Íons | <1% (livres ou ligados) |

Tabela 2 – Percentagens dos compostos do biofilme (adaptado de Sutherland, 2001)

Para que seja possível a aderência das bactérias colonizadoras (que podem ou não ser da mesma espécie) nas superfícies, as denominadas bactérias colonizadoras primárias produzem uma matriz exopolissacarídica (EPS), que ajuda à aderência à superfície, sendo que posteriormente podem passar a existir bactérias colonizadoras secundárias, que são aquelas que irão promover a colonização e o crescimento da estrutura criada, podendo aderir directamente sobre as colonizadoras primárias ou em agregados extra-celulares (Flemming, 2007).

A matriz EPS, vulgarmente chamada de visco ou matriz viscosa, devido às suas características de viscosidade, é constituída por polímeros de origem microbiana onde os

microrganismos formadores de biofilme estão aderentes (Seo, 2008). Visto que qualquer archeobactéria, bactéria ou ser eucariótico unicelular produz biopolímeros, qualquer ser unicelular terá capacidade de formar esta matriz (Flemming, 2007). A matriz EPS é por muitos autores determinante no processo de formação de biofilme, uma vez que é esta que promove a adesão das bactérias à maioria das superfícies, no entanto existem outros estudos que evidenciam que esta matriz não é estritamente necessária para que haja formação de biofilme (Robinson, 2000).

É também a matriz EPS a porção do biofilme que irá sofrer interações com o meio ambiente, uma vez que é a camada mais externa do aglomerado bacteriano aquando da formação deste, promovendo a aderência dos biofilmes às superfícies e apresentando também algumas capacidades de absorção que permitem sequestrar partículas nutritivas da zona envolvente.

4.3 Etapas do processo de formação

A formação de biofilme é um processo dinâmico e complexo, que pressupõe determinadas etapas. Uma das primeiras teorias sobre as etapas de formação de biofilme foi descrita por Marshall em 1971, o qual sugeriu que este é um processo que acontece em duas fases: a primeira, quando o processo ainda é reversível, em virtude da adesão do microrganismo na superfície (Percival, 1997; Donlan, 2002) Na segunda fase, ocorre a interação física da célula com a superfície, sendo que é nesta fase que se dá a síntese do material extracelular de natureza polissacarídica produzida pela bactéria, o já referido EPS.

Hoje em dia, é usual considerar-se este processo dividido em 3 ou 4 fases (Trachoo, 2003), apesar de se basear no mesmo princípio que a teoria de Marshall, como se pode ver na Figura 6, onde a primeira fase se inicia com a adesão à superfície, seguida das fases de maturação e desagregação. Pode ver-se também a colonização por bactérias existentes no meio envolvente, assim como a disseminação do biofilme, onde parte deste se solta de forma a aderir a outras superfícies.

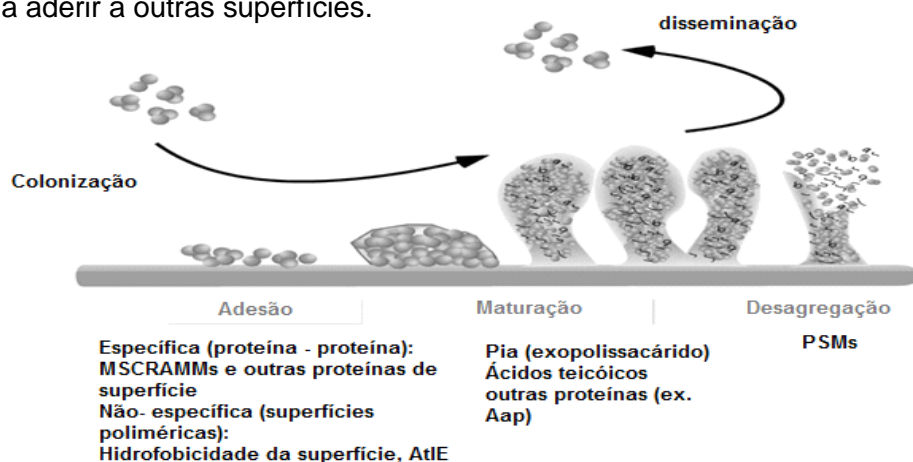


Figura 6 – Fases do desenvolvimento de biofilme

A adesão, caracterizada pela acção de diferentes forças e ligações covalentes, pode ser mediada por enzimas do tipo sortase, sendo uma das mais importantes a sortase A, e estas são responsáveis pela ligação covalente entre as proteínas da superfície e o peptidoglicano bacteriano. As proteínas bacterianas que reconhecem as moléculas adesivas extracelulares são frequentemente denominadas de MSCRAMMs (componentes da superfície bacteriana reconhedores de moléculas adesivas - *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) e são responsáveis pela adesão específica entre as proteínas bacterianas e as proteínas de superfície (Jefferson, 2004). Os *S. aureus* apresentam uma maior variedade e quantidade de moléculas de superfície reconhedoras de adesinas, MSCRAMM comparativamente a espécies coagulase negativas, como o caso do *S. epidermidis* que apresenta cerca de 12 MSCRAMM deste tipo (Gill *et al.*, 2005).

Os biofilmes podem aumentar a espessura da sua camada ao longo do tempo, aquando da etapa da maturação, e uma vez que pode haver agregação de outras bactérias à camada primeiramente formada, a fase de colonização é frequentemente considerada como parte do processo na bibliografia. Podem também ser desagregadas da superfície em que se encontram, sendo que este acontecimento é considerado uma vantagem à proliferação e crescimento do aglomerado bacteriano, uma vez que desta forma podem agregar-se a outra superfície, como um novo nicho de crescimento, que lhes permita ter melhores condições de prolificidade (Boles, 2011).

4.4 Propriedades da adesão a diferentes superfícies

As propriedades da capacidade de adesão das bactérias a diferentes superfícies dependem essencialmente de três factores: 1) Características da célula bacteriana, 2) Características da superfície e 3) Características do meio envolvente, como se pode ver esquematizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais variáveis implícitas na adesão bacteriana e formação de biofilme

| Célula | Superfície | Meio envolvente |
|--|-------------------|------------------------|
| Hidrofobicidade | Textura e dureza | Velocidade |
| Presença de fímbrias e flagelos | Hidrofobicidade | Temperatura |
| Substâncias poliméricas extracelulares | Adesão bacteriana | pH |
| | | Presença de catiões |
| | | Agentes microbianos |

4.4.1 Interações moleculares de adesão

Durante o processo de adesão à superfície, há interacção entre as moléculas da estrutura biótica ou abiótica e dos microrganismos, assim como da estrutura molecular do meio

envolvente. Estas interações inter-moleculares, que podem ser de natureza electrostática, covalente, de hidrogénio ou de dispersão (Robinson, 2000; Araújo *et al.*, 2010), podem ter um papel repulsivo ou atractivo para a adesão microbiana, dependendo das características polares das bactérias, da superfície e do meio envolvente. Nesta fase, as bactérias apresentam ainda movimento browniano, ou seja, movimento aleatório rápido numa matriz (água, ar, etc...), sendo que desta forma podem ser removidas por lavagens de deslocamento.

Já na segunda fase, o processo de interacção entre o aglomerado bacteriano e a superfície dá-se por interações dipolo-dipolo, ligações iónicas, covalentes e por pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas (Robinson, 2000; Araújo *et al.*, 2010) sendo que nesse momento a célula encontra-se ligada ao substrato, o que dificulta a remoção do biofilme, tornando-se importante nesta fase do processo a utilização de forças mecânicas, como raspagens e lavagens, para a sua remoção (Caixeta, 2008)

Nas bactérias, são essencialmente as biomoléculas da parede celular que determinam as propriedades da sua superfície e, conseqüentemente, a dinâmica da adesão bacteriana. Como se sabe, a parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída por uma única camada espessa de peptidoglicano (~30 nm), enquanto a parede celular das Gram-negativas apresenta múltiplas camadas, apresentando uma estrutura e composição da membrana mais complexas. A superfície da parede das bactérias Gram-positivas é coberta por peptidoglicanos (cerca de 90% da sua estrutura) e diferentes proteínas e ácidos teicóicos (Figura 7).

O peptidoglicano, como se pode ver na Figura 7, funciona como um esqueleto da parede, e é constituído por N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmuramico (NAM) que se unem através de ligações β 1-4, formando uma rede complexa que sofre dissociações, sendo que estas moléculas são úteis à formação de biofilmes, uma vez que fazem parte da constituição do visco, assim como polímeros extra-celulares anexos às células.

Existem diversas espécies de bactérias que apresentam flagelos e fímbrias, sendo estas

comummente importantes para a adesão das bactérias à superfície.

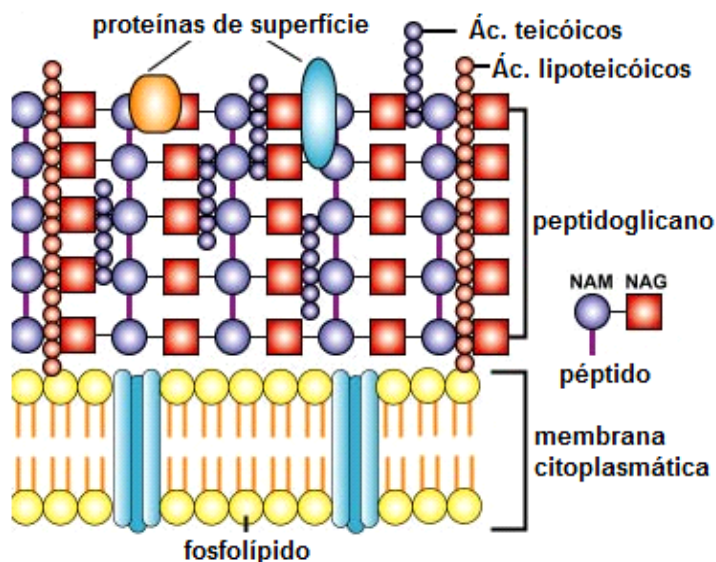


Figura 7 – Esquema representativo da parede celular de uma bactéria Gram + (Adaptado de student.ccbcmd.edu)

4.4.2 Características inerentes à relação de ligação entre superfície-célula

Relativamente às características da superfície, estas dependem principalmente da temperatura e da polaridade da superfície em questão. Ao haver mudanças nas propriedades de superfície induzidas, por exemplo, por diferentes valores de pH do ambiente, pode surgir um aumento de adesão bacteriana à superfície. Tal como referido anteriormente, o aço inoxidável utilizado na indústria alimentar pode ser produzido em várias camadas de polimerização, de acordo com o seu polimento, sendo que a textura ou dureza são também factores que afectam a adesão bacteriana graças às suas propriedades físico-químicas.

O aço inoxidável é considerado um composto hidrofóbico (Planchon, 2006). A hidrofobicidade da superfície e das células bacterianas é um dos factores mais importantes para o processo de adesão celular e posterior desenvolvimento do biofilme. A hidrofobicidade é definida como o grau de capacidade de humificação (sendo a humificação a tensão superficial existente entre um líquido e um sólido em meio líquido, ou seja, a capacidade que um líquido tem em molhar uma superfície) da superfície num meio aquoso. Uma vez que esta adesão física é favorecida entre superfícies hidrofóbicas, as conexões entre substâncias ambas polares ou ambas não-polares é mais forte do que entre substâncias polar e não-polar (Araújo, 2010).

Tal como já referido, os diferentes graus de hidrofobicidade das células são conferidos por factores de virulência associados à adesão, como as fímbrias e os flagelos, bem como pela membrana externa, no caso de bactérias gram-negativas, assim como pelos diferentes graus de electronegatividade conferidos através da presença de grupos funcionais polares, como fosfatos, carboxilos, hidroxilos e ácido teicóico (Flach, 2005). Assim, sendo o aço inoxidável uma superfície hidrofóbica, quanto maior for a hidrofobicidade da célula, maior a facilidade de adesão inicial de um microrganismo às superfícies de processamento alimentar.

É de salientar que a adesão é também dependente da presença de diversos catiões, como o cálcio, magnésio ou o cloreto de sódio, sendo que a presença destes no meio envolvente aumenta a capacidade de formação de biofilme (Planchon, 2006).

Já foi também relatado que uma diminuição nos níveis de oxigénio do meio induz modificação estrutural no lipopolissacárido (LPS) de algumas bactérias, resultando num aumento da hidrofobicidade da célula. Isto indica que a bactéria é capaz de alterar as características da superfície celular, como a hidrofobicidade, em função das mudanças no ambiente externo (Palmer, 2007).

4.5 Características da formação de biofilmes em bactérias do género *Staphylococcus*

A formação de biofilmes é uma característica comum a uma multitude de microrganismos, sendo conduzida por diferentes características e mediadores inerentes a cada género ou espécie. Desta forma, proceder-se-á à descrição das principais características inerentes à capacidade de formação de biofilmes dentro do género *Staphylococcus*.

4.5.1 Características de adesão, maturação e desintegração por *Staphylococcus*

Tal como a maioria das bactérias, os estafilococos formam biofilmes a partir de uma adesão inicial a uma superfície, podendo esta ser de origem biológica ou não. Os estafilococos coagulase negativos estão descritos como um dos principais grupos de bactérias formadoras de biofilmes em cateteres venosos, sendo que podem causar infecções aquando da sua desintegração para o sistema circulatório de animais de sangue quente (Mack, 1999).

A adesão dos estafilococos a uma matriz pode ser caracterizada como específica quando existem interacções inter-proteicas que medeiam a adesão, sendo que nestes casos, é necessária a presença de determinadas proteínas para que haja interacção entre as bactérias e a superfície (como é o caso de aderências a cateteres venosos, tendo estes presentes determinadas proteínas sanguíneas como o fibrinogénio e a fibronectina). Pode também caracterizar-se como inespecífica caso a adesão seja mediada entre uma superfície abiótica (que não contém teor proteico na superfície) e as bactérias. A adesão dos *Staphylococcus* a uma matriz pode prender-se pela expressão de MSCRAMM, sendo demonstrada uma capacidade em reconhecer as proteínas existentes na superfície e ligá-las a si, promovendo desta forma a adesão inicial às superfícies, seguindo-se a formação de visco e a maturação do biofilme microbiano (Patti *et al.*, 1994; O’Gara, 2007).

Em suma, os mecanismos que compõem a constituição da parede das bactérias Gram+, entre elas os *Staphylococcus*, envolvem tanto ligações covalentes para a adesão das proteínas aos peptidoglicanos da parede quanto ligações não-covalentes que conectam as proteínas a outros polímeros da parede, como os ácidos teicóicos (Navarre *et al.*, 1999).

4.5.1.1 Gene *ica*

A fase de crescimento ou maturação, em que as bactérias se unem entre si e formam o visco, pode ser mediada por determinados ácidos teicóicos, determinadas proteínas como a Aap (*accumulation-associated protein*) e também por uma adesina denominada PIA (*polyssacharide intercellular adhesine*) ou PNAG (*polymeric N-acetyl-glucosamine*) constituída por moléculas de peptidoglicanos unidas entre si, como pode ver-se na Figura 8.

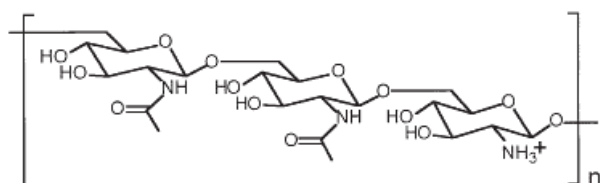


Figura 8 – Estrutura do PIA (Adaptado de Mack *et al.*, 1996)

O PIA é um açúcar composto por resíduos N-acetilglucosamina ligados por ligações β -1,6 entre si. Cerca de 20% dos resíduos estão deacetilados, apresentando desta forma uma carga positiva. O PIA manifesta-se através das enzimas codificadas pelo *ica* (*intercellular adhesion*) sendo este mecanismo de formação de biofilme um dos mais conhecidos e também ligado aos *Staphylococcus*.

O locus *ica* está implicado na formação de biofilmes por *S. aureus*, sendo que a sua presença em bactérias CNS está aparentemente relacionada com o factor de virulência destas (Cramton *et al.*, 1999; O’Gara, 2007; Romeo, 2008). Este operão é composto por um gene regulatório *icaR*, e quatro genes para a biossíntese, *icaABCD* (Gotz, 2002; O’Gara, 2007)

O processo de formação de biofilme por *Staphylococcus* que contém o operão *ica* (Figura 9) dá-se através da produção de proteínas transmembranárias homólogas às transferases de PIA através do gene *icaA*. A presença do *icaD* irá favorecer esta produção. Os polímeros formados através destes dois genes atingem tamanhos reduzidos, sendo que novas e maiores cadeias são sintetizadas graças à presença do gene *icaC* (Gerke *et al.*, 1998). Este gene está também relacionado com a passagem destes polissacarídeos para a extremidade da célula, de forma a poder estar à superfície destas. Após esta fase, o gene *icaB* promove a deacetilização desta molécula de forma a formar-se o PIA (Gotz, 2002). Em caso de não haver promoção desta última etapa, as bactérias não apresentam capacidade de formar biofilme através deste gene, uma vez que não irão apresentar polissacarídeos dispostos a esta função (Vuong *et al.*, 2004).

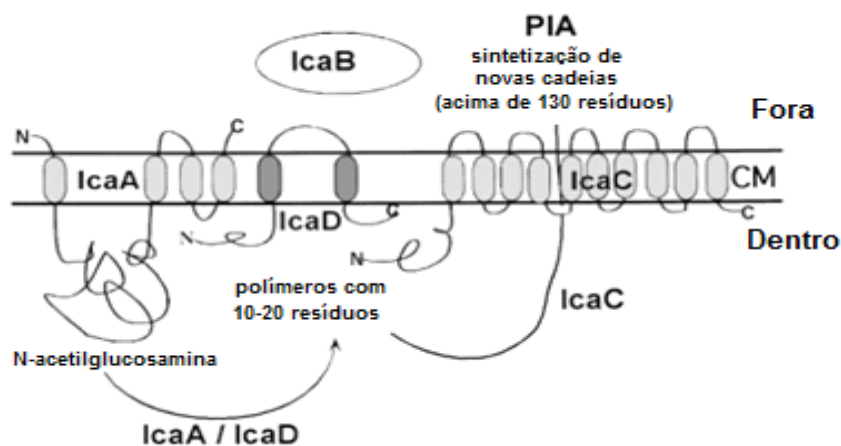


Figura 9 – Modelo esquemático da síntese de PIA (Adaptado de Gotz, 2002)

4.5.1.2 Gene Bap

Como já referido, a formação de biofilme não tem que estar dependente do locus *ica*, podendo estar associada a uma série de diversos factores e outros genes e proteínas que podem promover a formação deste aglomerado sem necessariamente haver interacção do operão *ica*.

Um dos primeiros mecanismos estudados acerca da independência do gene *ica* para a formação de biofilmes foi através da verificação da existência de um outro operão, o Bap (*Biofilm associated protein*/proteína associada a biofilme), que é importante tanto para a adesão inicial como para a acumulação intercelular em variadas estirpes estafilocócicas, entre elas o *S. aureus* (V329) (Cucarella *et al.*, 2001). Além deste operão, existem muitos outros com homologia que estão relacionados a várias espécies formadoras de biofilmes, como pode ver-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Homólogos do Bap relacionado com a espécie, a percentagem de homologia com o Bap pertencente ao *S. aureus* e a função que apresenta para a formação de biofilme (Adaptado de Latasa *et al.*, 2006)

| Proteína | Microorganismo | Homologia com o Bap | Função |
|----------|--------------------------------|---------------------|---|
| Bap | <i>Staphylococcus aureus</i> | ----- | Adesão primária e formação de biofilme em superfícies abióticas; Relacionado com infecções persistentes |
| Mus 20 | <i>Pseudomonas putida</i> | 29% | Relacionado com colonizações após desagregação |
| BapA | <i>Salmonella enteritidis</i> | 28% | Colonização |
| Bap | <i>Bukholderia cepacia</i> | 33% | Etapas finais da formação de biofilme |
| Espfm | <i>Enterococcus faecium</i> | 27% | Adesão a células eucarióticas |
| Esp | <i>Enterococcus faecalis</i> | 26% | Adesão primária e formação de biofilme em superfícies abióticas; Colonização e persistência no tracto urinário |
| LapA | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 25% | Passagem para a fase de adesão irreversível no processo de formação; Adesão a areias de quartzo |
| YeeJ | <i>E. Coli</i> | 21% | Adesão às superfícies |
| VP1443 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 20% | Maturação do biofilme |

O gene Bap, além de estar envolvido na adesão primária à superfície, tem também um papel importante na relação intercelular após a formação do aglomerado bacteriano. Este último processo pode envolver também o PIA, tendo sido descrito por Cucarella *et al.* (2001) que a diminuição ou inativação do gene Bap leva a uma diminuição da produção de PIA. Já foi também relatado que a inexistência do gene *ica*, ou seja, a não formação de PIA em estirpes que apresentavam o gene Bap, levavam igualmente à formação de biofilme, sendo por isso possível que a expressão do Bap seja suficiente para promover um desenvolvimento de biofilme em superfícies abióticas, sem necessidade do PIA (Latasa *et al.*, 2006).

Este gene, além de presente em espécies de *S. aureus*, pode também ser encontrado em outras espécies estafilocócicas, entre elas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus hyicus* (Tormo *et al.*, 2005), sendo que está também relacionado com um aumento da capacidade infecciosa bacteriana (Gotz, 2002).

Apesar da sua capacidade de infecção, através de mecanismos ainda pouco conhecidos, recentemente verificou-se que estirpes que continham o gene Bap demonstravam capacidade de adesão diminuída em estruturas que continhas fibrinogénio ou fibronectina, tecidos glandulares mamários e células epiteliais relativamente a espécies que não apresentavam este gene, sugerindo uma relação estrita entre a proteína expressa e os MSCRAAMs (Latasa *et al.*, 2006).

4.5.1.3 Outros mecanismos inerentes à formação de biofilmes

Apesar da formação de biofilmes por diferentes géneros bacterianos se prender com diferentes factores e moléculas, ainda que homólogos entre si, apresentando diferentes funcionamentos e estruturas proteicas, o processo de formação de biofilmes é um assunto que vulgarmente leva a questões dúbias, uma vez que é pouco conhecido pela comunidade científica. É, por isto, um dos assuntos mais debatidos actualmente em diversas áreas e conhecimentos científicos.

Apesar de existirem relatos em que o PIA pode ser sintetizado por outros operões além do *ica*, é importante referir que este polissacarídeo, como anteriormente descrito, apenas apresenta funções de adesão intercelular, contribuindo desta forma para a formação de visco. No entanto, estas adesões podem ser mediadas por outras proteínas ou outras formas não proteicas existentes nas paredes celulares. Desta forma, outras proteínas como a Aap (*accumulation associated protein*/proteína associada à acumulação) ou a DltA (D-alanina esterificante do ácido teicóico) são exemplos de outras moléculas com extremo interesse na formação de biofilmes (Gotz, 2002). É de referir também que para a etapa de desagregação, considerada a última etapa na formação de biofilmes, as células estafilocócicas podem apresentar a capacidade de desintegrar-se da matriz formada pelo

biofilme de forma a poderem passar a outros tecidos e superfícies. Desta forma, sugere-se que haja uma forma de não-expressão dos genes que contribuem para a formação do biofilme, uma vez que o processo de desintegração para infecção ou contaminação de novas superfícies pressupõe uma determinação fenotípica negativa quanto à existência de proteínas capazes de formar biofilmes.

II - TRABALHO EXPERIMENTAL

1. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivos a identificação e caracterização tecnológica dos isolados estafilocócicos provenientes de superfícies do ambiente fabril de três unidades situadas na região do Alentejo, e a avaliação da capacidade que estirpes de estafilococos coagulase negativos apresentam em formar biofilmes. Uma selecção de estirpes interessantes como iniciadoras de fermentação será efectuada perante as características fenotípicas e genotípicas que apresentam.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos isolados: colheita de amostras

O trabalho experimental foi realizado a partir de uma colecção de isolados de bactérias Estafilocócicas (N= 78) com origem em amostras provenientes do ambiente fabril de 3 unidades (A, B e C) de fabrico de produtos de salsicharia tradicional situadas no Alentejo.

A colheita das amostras e os métodos analíticos microbiológicos utilizados tiveram por base os requisitos normativos internacionais ISO (*International Organization for Standardisation*).

Nas três unidades foram colhidas amostras de quatro superfícies de trabalho, codificadas de acordo com a Tabela 5 e seguindo os requisitos da Norma ISO 18593:2004: a) misturadora; b) picadora; c) parede da sala de enchimento; d) enchedora.

As colheitas foram efectuadas após realização dos procedimentos comuns de limpeza e desinfecção das superfícies, seguidas habitualmente por cada fabricante. Foram amostrados 500 cm² de superfície em cada local de colheita, usando um delimitador estéril e compressas estéreis humedecidas com uma solução neutralizante (*Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, França*). O transporte das amostras foi efectuado em caixas isotérmicas, tendo as análises sido realizadas em menos de 24h. No laboratório, as compressas foram transferidas para 25 ml de solução de água peptonada tamponada (*BPW, AES Laboratory*) e homogeneizadas no *stomacher*.

Após a preparação das amostras, foram efectuadas contagens de *Staphylococcus* coagulase negativos (expressas em logUfc/g) em meio manitol salt agar (MSA, Scharlau, Espanha) após um periodo de incubação a 37°C durante 48 horas, tendo-se retirado de cada amostra das placas que se apresentavam contáveis, oito colónias características de *Staphylococcus* (amarelas ou rosa) que foram novamente isoladas em manitol salt agar (MSA, Scharlau, Espanha) para posterior conservação.

Tabela 5 – Relação entre as 3 unidades fabris, A, B e C e as amostras colhidas de cada superfície, com a sua denominação

| | Misturadora | Picadora | Parede S. Enchimento | Enchedora |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A | S ₁ M _n | S ₂ M _n | S ₃ M _n | S ₄ M _n |
| B | S ₁ B _n | S ₂ B _n | S ₃ B _n | S ₃ B _n |
| C | S ₁ C _n | S ₂ C _n | S ₃ C _n | S ₃ C _n |

Legenda: n – número do isolado.

2.2 Conservação de isolados

Os isolados obtidos foram conservados em criotubos com caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, Espanha) e glicerol a 15% (Merck, Alemanha), tendo sido armazenados a -80°C.

2.3 Cultivo para revivificação

Cada um dos criotubos com o isolado seleccionado pôde ser descongelado à temperatura ambiente, sendo posteriormente semeadas duas pérolas de inóculo em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, Espanha) a 37°C durante 24 a 48 horas em aerobiose para revivificação.

2.4 Caracterização fenotípica dos isolados

2.4.1 Observação visual das colónias

Aos isolados cultivados em manitol sal agar (MSA) após o período de incubação, foi observada a conformação das colónias assim como o seu tamanho. Verificou-se também a coloração do meio, uma vez que este adquire uma coloração amarelada aquando da presença de bactérias capazes de fermentar o manitol, como as CNS. Foi posteriormente observada e registada a morfologia das colónias.

2.4.2 Catalase

Esta prova pretende determinar a capacidade dos microrganismos produzirem a enzima catalase, que degrada o peróxido de hidrogénio, obtendo-se água e oxigénio.

Desta forma, foi colocada uma colónia retirada do meio MSA numa lâmina à qual se adicionaram umas gotas de reagente catalase (ID-ASE, Biomerieux, França).

Se a bactéria possuir a enzima catalase (catalase positiva) ocorre o desdobramento do peróxido de hidrogénio, havendo libertação imediata de oxigénio que se traduz na formação de bolhas de ar; a ausência deste borbulhar corresponde a uma prova negativa.

2.4.3 Oxidase

A citocromo-oxidase é responsável pela catalisação da oxidação de um citocromo pelo oxigénio molecular, havendo formação de água. A capacidade das bactérias produzirem esta enzima pode ser determinada pela adição do reagente oxidase (Biomerieux, França). Assim, embebeu-se uma folha de papel de filtro em reagente oxidase, e com o auxílio de uma ansa, picou-se uma colónia colocando-a em contacto com o reagente.

O desenvolvimento de coloração violeta a violeta escuro na superfície do papel é indicativo da produção de citocromo-oxidase, representando uma prova positiva. Se não houver alteração da cor, ou se a superfície do papel de filtro apresentar uma coloração rosa ligeira é indicativo da ausência da actividade da oxidase, sendo por isso considerada uma prova negativa.

2.4.4 Coloração Gram

A coloração de Gram aplicada a esfregaços de colónias bacterianas é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia óptica, classificando-as em Gram positivas (cor violeta escuro) ou Gram negativas (cor rosa-avermelhado).

A técnica de coloração de Gram consiste em expor as células bacterianas na seguinte sequência de reagentes: violeta de cristal (corante primário, Scharlau, Espanha), solução de iodo (mordente, Scharlau, Espanha); álcool (agente descolorante, Scharlau, Espanha) e fucsina (agente contrastante, Scharlau, Espanha).

Para a observação das bactérias e sua coloração, utilizou-se um microscópio (Olympus, Inglaterra) com objectiva de imersão e ampliação 1000 x.

2.4.5 Critérios de selecção de isolados

Para a selecção dos isolados que presuntivamente são estafilococos, utilizaram-se os parâmetros da catalase (apenas catalase positivos), oxidase (apenas oxidase negativos) e a coloração Gram (apenas Gram +), sendo que a redução do manitol não deve ser considerada um critério de selecção uma vez que entre as espécies em questão, existem determinadas que fermentam e outras que não fermentam o manitol.

Desta forma, consideraram-se tanto os isolados manitol positivos (fermentação do manitol com passagem do meio de vermelho para amarelo), como isolados com fermentação lenta (coloração alaranjada) e inclusive isolados que não reduzem o manitol (coloração vermelha). Relativamente ao critério do tamanho da colónia, este foi considerado apenas como um elemento comparativo e não de exclusão ou inclusão.

2.5 Identificação genética de isolados de *Staphylococcus*

2.5.1 Cultura de isolados

Para a identificação genotípica dos isolados em estudo, considerados presuntivamente *Staphylococcus* spp., foi usada uma cultura pura de cada resultante de sementeira em placas de MSA (MSA, Scharlau, Espanha), a 37°C durante 24h. Após incubação, foram recolhidas colónias com uma ansa de 1µl (ROLL, S.A.S.) e efectuou-se a sua ressuspensão em meio Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, Espanha) que foi posteriormente colocado a 37°C durante 24h.

2.5.2 Extracção de DNA

Para a extracção do DNA, utilizou-se o método de Chelex 100, tal como descrito por Talon *et al.* (2007). Colocou-se 1ml da cultura obtida após incubação em BHI (ponto 2.5.1) num eppendorf de 1,5ml, agitou-se bem no vórtex e de seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 4500rpm, colocando-se posteriormente as amostras em gelo. Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet em 300 µl de Chelex 100 a 6% e agitou-se novamente no vórtex durante 10 a 15 segundos por amostra. Posteriormente, colocaram-se as amostras num banho a 100°C durante 8 minutos, sendo que depois se fez novo vortex durante 10 segundos seguido de arrefecimento rápido em gelo por 2 minutos. Centrifugou-se a 4500 rpm o tubo durante 5 minutos a 4°C de onde posteriormente se retirou 50-80 µl do sobrenadante, para ser conservado em refrigeração até à sua utilização.

2.5.3 Identificação genética de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus*, *S. simulans* e *S. equorum*

A identificação das diferentes espécies de *Staphylococcus* foi feita a partir da técnica Polymerase chain reaction (PCR), sendo as condições destes diferentes entre as espécies de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, de *S. carnosus*, *S. simulans* e de *S. equorum*, uma vez que apresentavam condições de PCR diferentes entre eles.

Tanto as condições de PCR efectuadas como as de electroforeses basearam-se nas descritas por Carvalho (2010).

2.5.3.1. Condições de PCR multiplex para a identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus*

A Tabela 6 descreve os primers utilizados no PCR multiplex para a identificação das diferentes espécies estafilocócicas, assim como utilizado para a identificação do género, o tamanho do fragmento amplificado, os controlos positivos utilizados (como estirpes de referência) e as condições dos ciclos de PCR multiplex. Estes primers foram seleccionados

tendo em conta a compatibilidade termodinâmica e a produção de bandas de PCR distintas em tamanho por electroforese.

Tabela 6 – Condições do PCR multiplex para as espécies de *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. epidermidis*, tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers utilizados e controlos positivos de cada espécie

| Espécie | Fragm. Amplif. | Primer: designação e sequência (5' - 3') | Controlo positivo | Ciclo PCR |
|------------------------------|----------------|--|---------------------------------------|---|
| <i>Staphylococcus</i> género | 370 pb | TstaG422: GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A Tstag765: TTA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A | | 95°C/1seg 94°C/3min 55°C/30seg 40 ciclos 72°C/30seg 72°C/3min |
| <i>S. aureus</i> | 108 pb | Sa442-1: AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG Sa442-2: CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA | <i>S. aureus</i> ATTC 29213 | |
| <i>S. saprophyticus</i> | 221 pb | Sap1: TCA AAA AGT TTT CTA AAA AAT TTA C Sap2: ACG GGC GTC CAC AAA ATC AAT AGG A | <i>S. saprophyticus</i> DSMZ 18669 | |
| <i>S. xylosus</i> | 539 pb | Xyl F: AAC GCG CAA CGT GAT AAA ATT AAT G Xyl R: AAC GCG CAA CAG CAA TTA CG | <i>S. xylosus</i> ATTC 8166 | |
| <i>S. epidermidis</i> | 124 pb | Se705-1: ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A Se705-2: CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A | <i>S. epidermidis</i> ATTC RP62A | |

Legenda: pb – pares de base.

2.5.3.2 Condições de PCR para a identificação de *S. carnosus*, *S. simulans* e *S. equorum*

A Tabela 7 descreve os primers utilizados em cada PCR efectuado para a identificação das espécies *S. carnosus*, *S. simulans* e *S. equorum*, o tamanho dos fragmentos amplificados, os controlos positivos utilizados (como estirpes de referência) e as condições dos ciclos de PCR. Estes primers foram seleccionados tendo em conta a compatibilidade termodinâmica e a produção de bandas de PCR distintas em tamanho por electroforese.

Tabela 7 – Condições do PCR para as espécies de *Staphylococcus carnosus*, *S. simulans* e *S. equorum*, tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers utilizados e controlos positivos de cada espécie

| Espécie | Fragm. Amplif. | Primer: designação e sequência (5'-3') | Controlo positivo | Ciclo PCR |
|--------------------|----------------|--|--|---|
| <i>S. carnosus</i> | 195 pb | Car F: TTC TAA CAC CTA ATT CTG AAG A Car R: GAT TGG ATT GTC TTG GTT AGG A | <i>S. carnosus</i> CECT 4491 ou DSMZ 4600 | 95°C/3min 95°C/5seg 60°C/30seg 30 ciclos 72°C/30seg 72°C/3min |
| <i>S. simulans</i> | 197 pb | Sim F: ATC CTT TCA CCT AAC TCT GAA GAG Sim R: GTA ATT GGG TTG TCT TGG TTT GCT | <i>S. simulans</i> DSMZ 20323 | 95°C/3min 95°C/5seg 66°C/30seg 30 ciclos 72°C/30seg 72°C/3min |
| <i>S. equorum</i> | 193 bp | SdAEqF GTG GAG GAC ACT TAA ACC ATT C SdAEqR CAA TTT ACC ATC GTT TAC AAC TAG | <i>S. equorum</i> DSMZ 20029 | 95°C/3min 95°C/5seg 61°C/25seg 30 ciclos 72°C/30seg 72°C/3min |

Legenda: pb – pares de base.

2.5.3.3 Mix de Reagentes – PCR multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis* e *Staphylococcus* género

A amplificação do PCR para as espécies *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis* e *Staphylococcus* género foi executada com 1,5 µl de DNA amostra, prefazendo um total de 25 µl. A mistura de reagentes continha 0,5 µM dos primers Xyl F/Xyl R, 0,5 µM dos primers Sap1/Sap2, 0,5 µM dos primers Se705-1/Se705-2, 0,5 µM dos primers Sa442/Sa442-1, 0,5 µM dos primers Tstag765 e TstaG422, 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA), 200 µM de desoxiribonucleosido trifosfato (dNTP's) (GE Healthcare, Inglaterra), 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

2.5.3.4 Mix de Reagentes – PCRs para identificação de *Staphylococcus carnosus*, *S. simulans* e *S. equorum*

A amplificação para a espécie *Staphylococcus carnosus* foi executada com 1,5 µl de DNA amostra, prefazendo 25 µl de volume após a adição dos 1,5 µl de amostra DNA. A mistura de reagentes continha 0,5 µM (de cada) dos primers carF e carR, 0,25 mM de desoxiribonucleosido trifosfato (dNTP's) (GE Healthcare, Inglaterra), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

Para a espécie *Staphylococcus simulans* foi utilizado 1,5 µl de DNA amostra, prefazendo 25 µl de volume após a adição dos 1,5 µl de amostra DNA. A mistura de reagentes continha 0,5 µM (de cada) dos primers simF e simR, 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA), 0,25 mM de desoxiribonucleosido trifosfato (dNTP's), 2,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂), e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

A amplificação de *S. equorum* foi executada com 1,5 µl de DNA amostra, prefazendo 25 µl de volume após a adição dos 1,5 µl de amostra DNA. A mistura de reagentes continha 0,5 µM de cada primer SdAEqF e SdAEqR, 0,25 mM de desoxiribonucleosido trifosfato (dNTP's), (GE Healthcare, Inglaterra), 2,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA), 2,0 µl de tampão 10x (Roche,USA) e 1U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

2.5.3.5 Condições de electroforese para revelação dos produtos das reacções de PCR

A revelação dos produtos PCR foi efectuada através de electroforese utilizando-se 5 µl de uma mistura do produto amplificado com 1 µl de Gel Red e 1 µl de Bromofenol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) que correram num gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 2% em TBE 1X (Sigma, USA) aplicando-se uma voltagem de 75V durante 1 hora.

A visualização dos fragmentos foi feita por transiluminância em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

2.6 Caracterização tecnológica das espécies de *Staphylococcus* presentes em superfícies do ambiente fabril

As espécies identificadas anteriormente foram caracterizadas através de avaliação da actividade proteolítica, lipolítica e nitrato redutase, de forma a prever a sua utilização ou não como cultura de arranque. Estes procedimentos basearam-se nos descritos por Carvalho (2010). Como controlos positivos utilizaram-se as estirpes de referência *S. aureus* (ATTC 29213) e *S. xylosus* (ATTC 8166) para a determinação das actividades lipolítica e nitrato-redutase, respectivamente. Para a determinação da actividade lipolítica utilizou-se também um controlo negativo, *Proteus mirabilis* (ATTC 25933).

2.6.1 Prova da Actividade Lipolítica

No meio Spirit Blue Agar (Becton Dickinson, França), depositou-se com o auxílio de uma micropipeta, 10 µl de cultura após crescimento em BHI, apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 48 horas. O aparecimento de halo indicou a presença de actividade lipolítica. Desta forma, mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado, procedendo-se posteriormente ao registo dos dados.

2.6.2 Prova da Actividade Proteolítica

Com o auxílio de uma micropipeta depositou-se no meio de cultura [que continha 6g de Potato Carrot Agar (PCA, Scharlau, Espanha), 25g de gelatina e peptona (Scharlau, Espanha) e 10ml de solução de leite em pó magro (12,5% em água destilada)], 10 µl da cultura do isolado em avaliação após crescimento em BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 48 horas. Ao fim do tempo previsto inundou-se a placa com a solução de Bicloreto de Mercúrio a 1,5% (Merck, Alemanha). O aparecimento de um halo opaco indicou a presença de actividade proteolítica. Mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado e registou-se o valor obtido.

2.6.3 Prova da Actividade Nitrato-Redutase

Com o auxílio de uma micropipeta depositou-se no meio Yeast Triptone Agar [composto por 1% de triptona, 0,5% de extracto de levedura, 1,5% de agar (Scharlau, Espanha), suplementado com 1g/L de Nitrato de Potássio (Merck, Alemanha)], 10 µl da cultura do isolado em avaliação após crescimento em BHI apresentando uma absorvância a 625 nm de 0,8 a 1,0. Incubou-se a 30°C durante 24 horas, 20°C durante 48 horas e a 15°C durante 72 horas.

Ao fim dos tempos de incubação preconizados a placa foi inundada com uma solução de NIT1:NIT2 (Merck, Alemanha). O aparecimento de halo roxo indicou a presença de actividade nitrato redutase. Mediu-se, com o auxílio de uma régua, o halo formado e registou-se. A intensidade da coloração foi apreciada qualitativamente com “+”, “++”, “+++” e “++++”.

2.7 Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus coagulase negativos* para a capacidade de formar biofilme

A avaliação da capacidade de formar biofilmes pelas espécies de estafilococos identificadas foi efectuada através da expressão fenotípica de formação de visco e por avaliação genética da presença dos genes *ica* e Bap.

Para a caracterização fenotípica da formação de visco (*slime*) utilizou-se o método CRA (Congo Red Agar), que foi baseado no protocolo descrito por Freeman *et al.* (1989).

Na caracterização genética, foram amplificados dois genes, *ica* e Bap, de acordo com os protocolos descritos por Moretto *et al.* (2003) e Planchon *et al.* (2006).

2.7.1 Caracterização fenotípica da capacidade de formação de visco

Para a avaliação da formação de visco por bactérias de diferentes espécies de *Staphylococcus*, efectuou-se a sua cultura em estria (200µl) no meio de cultura CRA (1 litro de meio de cultura composto por 37g de BHI (BHI, Scharlau, Espanha), 32g de sacarose (Sigma, Missouri, USA), 10g de agar-agar (Scharlau, Espanha) e 0,8g de vermelho do

Congo (Sigma, Missouri, USA), filtrado para o meio previamente esterilizado, enquanto a 55°C, a partir de uma solução stock de 8g/L).

Incubaram-se as placas a 37°C durante 24h para primeira avaliação, tendo sido deixadas à temperatura ambiente por mais 24h para nova avaliação. As placas dos isolados que apresentavam colónias de coloração negra foram consideradas estirpes formadoras de biofilmes e aquelas que apresentavam colónias cor de vinho consideraram-se fracas formadoras de biofilmes, enquanto as que não apresentavam alteração colorimétrica (ficando vermelhas), consideraram-se não formadoras de biofilmes. Como controlo positivo utilizou-se uma estirpe de referência formadora de biofilme, *S. epidermidis* RP62A (Arciola *et al.*, 2002).

2.7.2 Identificação dos genes *ica* e Bap

2.7.2.1 Condições de PCR

A Tabela 8 descreve os *primers* utilizados para a identificação dos genes, o tamanho do fragmento amplificado, os controlos utilizados (positivos - *ica*: *S. epidermidis* ATTC RP62A, *S. aureus* NCTC 8325; Bap: *S. simulans* DSMZ 20323; negativos - *ica*: *S. saprophyticus* DSMZ 18669; Bap: *S. epidermidis* ATTC RP62A) e as condições dos diferentes ciclos de PCR. Além dos controlos positivos e negativos utilizados.

Tabela 8 – Condições de PCR para os genes *ica* e Bap, tamanhos dos fragmentos amplificados, designação e sequência dos primers, controlos positivos e controlos negativos de cada gene

| Gene | Fragm. Ampl. | Primer: designação e sequência (5' - 3') | Controlo positivo | Controlo Negativo | Ciclo PCR |
|------------|--------------|---|--|--|--|
| <i>Ica</i> | 568 pb | Ica4F: TGG GAT ACT GAY ATG ATT AC Ica4R: CCT CTG TCT GGG CTT GAC CAT G | <i>S. epidermidis</i> ATTC RP62A | <i>S. saprophyticus</i> DSMZ 18669 | 94°C/2min 94°C/20seg 42°C/20seg 30 ciclos 72°C/50seg 72°C/5min |
| <i>Bap</i> | 970 pb | Sasp-6m: CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC Sasp-7c: GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC | <i>S. simulans</i> DSMZ 20323 | <i>S. epidermidis</i> ATTC RP62A | 94°C/5min 94°C/30seg 55°C/30seg 30 ciclos 72°C/45seg 72°C/7min |

Legenda: pb – pares de base.

2.7.2.2 Mix de reagentes

A amplificação do PCR para a identificação dos genes *ica* e *Bap* foi executada com 1,5 µl de DNA amostra. Cada mistura de reagentes com um volume total de 23,5 µl continha 0,25 µM de cada primer *Ica4F/Ica4R* ou *Sasp-6m/Sasp-7c*, 2,5 µl de tampão 10x (Roche, USA), 200 µM de desoxiribonucleosido trifosfato (dNTP's) (GE Healthcare, Inglaterra), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Roche, USA) e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal) (Adaptado de Moretto *et al.*, 2003 [gene *ica*] e e Planchon *et al.*, 2006 [gene *Bap*]).

2.7.2.3 Condições de electroforese para revelação dos produtos das reacções de PCR para identificação dos genes *ica* e *Bap*

A revelação dos produtos PCR para a identificação dos genes *ica* e *Bap* foi efectuada através de electroforese utilizando-se 5 µl de uma mistura do produto amplificado com 1 µl de Gel red e 1 µl de Bromofenol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol), que correram num gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 2% em TBE 1X (Sigma, USA) aplicando-se uma voltagem de 80V durante 2 horas.

A visualização dos fragmentos foi feita por transiluminância em UV (Pharmacia Biotech, Alemanha).

2.8 Análise Estatística

Efectuou-se uma análise dos resultados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007, construindo-se tabelas de dupla entrada e efectuando uma avaliação descritiva dos resultados.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação de *Staphylococcus* nas superfícies de trabalho do ambiente fabril

Na Tabela 9 apresentam-se as contagens de CNS (log ufc/500cm²) obtidas em cada superfície (S1, S2, S3 e S4) e nas diferentes fábricas (A, B e C), o número de isolados iniciais e a proporção de isolados presuntivos do género *Staphylococcus*.

Dos isolados bacterianos provenientes das superfícies do ambiente fabril (N=78), todos apresentavam conformação de cocos em cacho e eram Gram positivos (N=66) (Tabela 10), à excepção dos 8 isolados provenientes da superfície da picadora da Fábrica B (S2B₁₋₈) e de 4 isolados pertencentes à Fábrica C, também com origem na superfície da picadora (S2C2, S2C5, S2C6 e S2C7).

Tabela 9 – Descrição da contagem de CNS (log ufc/500cm²), número de isolados iniciais e proporção de isolados presuntivos do género *Staphylococcus* após testes de avaliação fenotípica, consideradas de acordo com cada fábrica e cada superfície

| | Fábrica A | | | | Fábrica B | | | | Fábrica C | | | |
|--|-----------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|----------|
| Superfícies | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 |
| Contagem de CNS log ufc/500cm ² | 4,3 | 3,4 | 3,3 | 5,1 | 2,6 | 1 | 3,3 | 3,4 | 2,3 | 1,7 | 1,3 | < 0,7 |
| Isolados iniciais (n) | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 2 | 8 | 8 | 8 | 8 | 4 | 0 |
| Isolados presuntivos descritivos de <i>Staphylococcus</i> | 0/8 | 8/8 | 6/8 | 4/8 | 7/8 | 0/2 | 8/8 | 8/8 | 6/8 | 4/8 | 1/4 | 0 |

Legenda: n – número de isolados utilizados; S1 – Misturadora; S2 – Picadora; S2 – Parede da sala de enchimento; S4 - Enchedora

Tabela 10 – Caracterização fenotípica dos isolados provenientes das superfícies do ambiente de três fábricas

| CODIFICAÇÃO | GRAM + COCOS EM CACHO | OXIDASE | | CATALASE | | MANITOL | |
|--------------------|-----------------------|---------|-----|----------|-----|---------|-----|
| | | + | - | + | - | + | - |
| S1M ₁₋₈ | 8/8 | 8/8 | 0 | 8/8 | 0 | 0 | 8/8 |
| S1B ₁₋₈ | 8/8 | 1/8 | 7/8 | 8/8 | 0 | 3/8 | 5/8 |
| S1C ₁₋₈ | 8/8 | 0 | 8/8 | 6/8 | 2/8 | 8/8 | 0 |
| S2M ₁₋₈ | 8/8 | 0 | 8/8 | 8/8 | 0 | 5/8 | 3/8 |
| S2B ₁₋₈ | 0 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| S2C ₁₋₈ | 4/8 | 0 | 4/4 | 4/4 | 0 | 4/4 | 0 |
| S3M ₁₋₈ | 8/8 | 2/8 | 6/8 | 8/8 | 0 | 4/8 | 4/8 |
| S3B ₁₋₈ | 8/8 | 0 | 8/8 | 8/8 | 0 | 8/8 | 0 |
| S3C ₁₋₄ | 4/4 | 1/4 | 3/4 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0 |
| S4M ₁₋₈ | 8/8 | 3/8 | 5/8 | 7/8 | 1/8 | 5/8 | 3/8 |
| S4B ₁₋₈ | 8/8 | 0 | 8/8 | 8/8 | 0 | 8/8 | 0 |

Legenda: S1 – Misturadora; S2 – Picadora; S2 – Parede da sala de enchimento; S4 – Enchedora, M_x – Fábrica A; B_x – Fábrica B; C_x – Fábrica C

Os isolados da superfície da misturadora provenientes da Fábrica A (S1M₁₋₈) eram todos catalase e oxidase positivos, não sendo por isso considerados *Staphylococcus* presuntivos. O mesmo sucedeu com 2 dos isolados provenientes da parede da sala de enchimento (S3M6 e S3M8) e 3 provenientes da enchedora (S4M5, S4M7 e S4M8) da Fábrica A, 1 com origem na misturadora (S1B2) da Fábrica B e 1 na superfície da parede da sala de enchimento (S3C2) da Fábrica C. De acordo com o esquema interpretativo de identificação de bactérias Gram + da ABIS online (2011), os 15 isolados Gram + e oxidase positivos

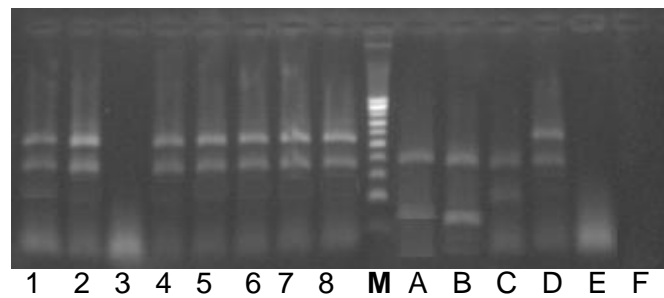
provenientes das diferentes fábricas podem pertencer ao género *Sacharococcus*, sendo este género caracterizado como facultativo anaeróbio e positivo às provas da catalase e oxidase, ou aos géneros *Micrococcus* ou *Deinococcus*, uma vez que se desconhece o crescimento facultativo destes em anaerobiose (sendo estes dois últimos géneros caracterizados por serem estritamente aeróbios).

Relativamente à prova da catalase, descrita como positiva em bactérias do género *Staphylococcus*, encontraram-se 3 isolados catalase negativos, 2 deles pertencentes à Fábrica C provenientes das superfícies da misturadora (S1C2, S1C3) e um pertencente à Fábrica A, proveniente da superfície da enchedora (S4M2). Todos estes se apresentavam também negativos à prova da oxidase. De acordo com o diagrama de identificação da ABIS, estes poderiam ser *Stomatococcus*, caso apresentassem actividade nitrato-redutase ou *Aerococcus* ou *Pediococcus*, caso não demonstrassem esta capacidade e apresentassem capacidade hemolítica ou não, respectivamente. Desta forma, visto que estes isolados foram descartados para o presente estudo, não foi possível determinar a sua capacidade nitrato-redutase, tendo esta apenas sido demonstrada nos isolados presuntivamente pertencentes ao género *Staphylococcus*. Uma vez que os 3 isolados negativos à prova da catalase se apresentavam com a conformação de cocos em cacho, a hipótese de pertencerem aos géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* ou *Lactococcus*, sendo estes possíveis de encontrar em ambientes fabris, não foi considerada. No entanto, os 8 isolados provenientes da picadora da Fábrica B (S2B₁₋₈), assim como os 4 isolados pertencentes à Fábrica C na superfície da picadora (S2C2, S2C5, S2C6 e S2C7) acima descritos como Gram + mas sem conformação em cacho, poderiam pertencer aos géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* ou *Lactococcus*.

Relativamente à capacidade dos isolados iniciais reduzirem o manitol, 68% destes apresentaram capacidade em reduzir o manitol, ocorrendo fermentação deste com consequente produção de ácido (L-lactato ou D-lactato), que leva à alteração do vermelho de fenol para amarelo (Carvalho, 2010). Os restantes 32% dos isolados não apresentaram esta capacidade redutora do manitol. Uma vez que existem espécies estafilocócicas redutoras e outras não redutoras do manitol, este critério não foi utilizado como selecção do género *Staphylococcus* (Butler, 1986).

A identificação genética do género *Staphylococcus* e espécies *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* foi efectuada, verificando-se que dos 48 isolados presuntivamente pertencentes ao género *Staphylococcus*, testados de acordo com as provas fenotípicas, 35 eram *Staphylococcus* ((Figura 10; *Staphylococcus* spp. – 370 pares de base). Destes isolados, 19 foram identificados como *S. xylosus* e 11 correspondiam a *S. saprophyticus*. Não foram identificados neste grupo de isolados as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*.

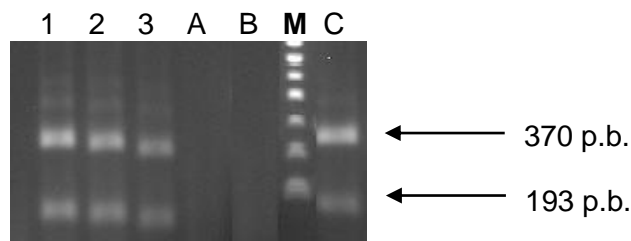
Figura 10 – Identificação genética de *Staphylococcus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*



Legenda: 1- S4B1; 2 – S4B2; 3 – S4B3; 4 – S4B4; 5 – S4B5; 6 – S4B6; 7 – S4B7; 8 – S4B8; M – marcador; A – *S. epidermidis* RP62A; B – *S. aureus* NCTR 29213; C – *S. saprophyticus* DSMZ 18669; D – *S. xylosus* NCTC 8166; E – *E. coli* (Controlo negativo); F – Branco

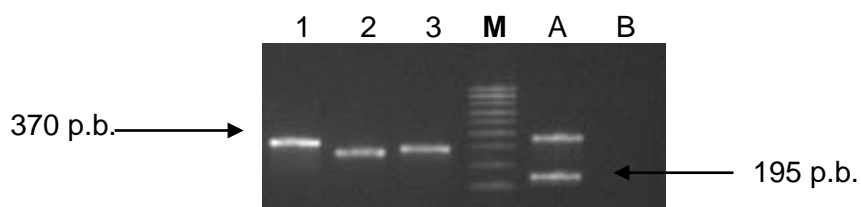
Dos isolados identificados para o género *Staphylococcus* no PCR multiplex (N=35) e não identificados em relação às espécies em teste foram posteriormente identificados como *S. equorum* (N=5, Figura 11). A reacção PCR efectuada para a espécie *S. carnosus* (Figura 12) não revelou a presença desta espécie nos isolados em estudo. Também a espécie *S. simulans* não foi detectada (Figura 13).

Figura 11 – Identificação genética da espécie *S. equorum*



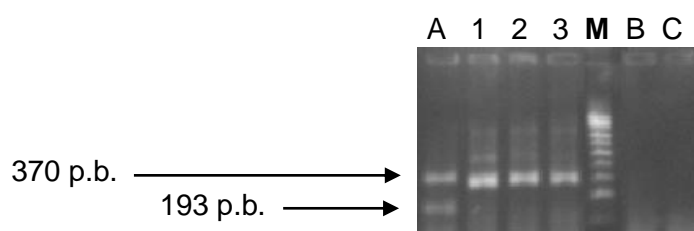
Legenda: 1 – S2M3; 2 - S2M4; 3 – S2M5; A – *E. coli* CCUG 42901 (Controlo negativo); B – Branco; M – marcador 100p.b.; C – *S. equorum* DSMZ 20029 (193 p.b.)

Figura 12 – Identificação genética da espécie *S. carnosus*



Legenda: 1 – S2M3; 2 - S2M4; 3 – S2M5; M – marcador; A – *S. carnosus* DSMZ 4600 (195p.b.); B – *E. coli* CCUG 42901 (Controlo negativo)

Figura 13 – Identificação genética da espécie *S. simulans*



Legenda: A – *S. simulans* DSMZ 20323 (197p.b.); 1 – S2M5; 2 – S2M8; 3 – S3M4; M – Marcador; B – *E. coli* CCUG 42901 (Controlo negativo); C - Branco

Nas diferentes superfícies de trabalho em estudo foram isoladas apenas três espécies do género *Staphylococcus*: *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. equorum*.

A espécie *S. xylosus* (N=19) encontrou-se em maior percentagem (54,3%) relativamente às outras espécies. A espécie *S. saprophyticus* foi identificada em 11 isolados (31,4%), tendo sido a segunda espécie mais encontrada. Já a espécie *S. equorum* representou 14,2% (N=9) do total dos isolados testados. Estas percentagens não são coincidentes com os estudos de Coton *et al.* (2010), Soares *et al.* (2011) e Leroy *et al.* (2010). Coton *et al.* (2010) estudaram as proporções entre espécies estafilocócicas em amostras alimentares provenientes de França, de onde 28,5% dos isolados pertenciam à espécie *S. equorum*, 28,3% a *S. xylosus*, 12,5% a *S. saprophyticus* e 7,7% pertenciam à espécie *S. succinus*. Já Soares *et al.* (2011) isolaram amostras provenientes do ambiente fabril de uma pequena fábrica portuguesa e ao identificar as espécies obtiveram 46% de amostras de *S. equorum*, 28% de *S. saprophyticus* e 10% de *S. epidermidis*, não tendo, no entanto, efectuado identificação da espécie *S. xylosus*. Leroy *et al.* (2010) identificaram quais as espécies que existiam em maior número em fábricas de pequena dimensão em França, e determinaram que 58,4% das suas amostras pertenciam à espécie *S. equorum*, 15,7% a *S. saprophyticus* e 9,3% a *S. xylosus*.

Apesar de a espécie *S. xylosus* ter sido identificada em maior número, esta não se encontrava presente em todas as superfícies do ambiente fabril (Tabela 11). Esta espécie aparece como dominante na superfície das paredes da sala da enchedora (S3) do ambiente fabril. A espécie *S. saprophyticus* foi a única espécie encontrada na superfície da misturadora (S1). Já na superfície da picadora (S2), a espécie mais encontrada foi a *S. equorum* (57,1%). Este facto pode dever-se à dificuldade de uma boa higienização do equipamento relativamente aos outros equipamentos, uma vez que a picadora apresenta pequenos espaços e pode haver dificuldade na remoção e limpeza por exemplo placas e semfins constituintes da picadora. Esta hipótese torna-se ainda mais forte uma vez que todas os isolados de *S. equorum* são provenientes da mesma fábrica (Fábrica A). Os *S. equorum* foram durante muitos anos confundidos com a espécie *S. xylosus*, sendo

actualmente uma espécie de larga importância em ambientes fabris, uma vez que representa 28,5% dos isolados de *Staphylococcus* em queijaria, salsicharia, ambientes fabris e amostras clínicas provenientes de França (Coton *et al.*, 2010), 10 a 40% de amostras provenientes de salsicharia do sul de Itália (Blaiotta *et al.*, 2004) e também por ser considerada uma das espécies com maior capacidade para persistir em ambientes fabris e de processamento alimentar, assim como de alimentos fermentados (Leroy *et al.*, 2009).

Quanto à parede (S3) e à enchedora (S4), foram as superfícies de trabalho que apresentaram maior percentagem de isolados identificados como *S. xylosus* (83,3% e 100%, respectivamente), tendo sido a parede (S3) aquela que contribuiu para um número tão elevado de amostras positivas desta espécie relativamente às outras. Na enchedora (S4) foi apenas identificada a espécie *S. xylosus*. A enchedora apresenta desafios de higienização, em parte devido à sua conformação cilíndrica, sendo de difícil desmontagem, podendo por estes factos ser comumente negligenciada a sua limpeza e aplicação de desinfetantes e detergentes. A evidência de elevada quantidade de isolados de *S. xylosus* pode dever-se à elevada capacidade que esta espécie apresenta em aderir a diferentes superfícies (com diferentes polarizações), facto também evidenciado por Planchon *et al.* (2006) e Almeida (2001).

Tabela 11 – Representação de dupla entrada da relação entre as espécies estafilocócicas encontradas e as suas proporções em cada superfície do ambiente fabril

| Superfície | <i>S. xylosus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. equorum</i> | | Total |
|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|--|-------|
| S1 | 0 | 9/9 | 0 | | 9 |
| S2 | 2/7 | 1/7 | 4/7 | | 7 |
| S3 | 10/12 | 1/12 | 1/12 | | 12 |
| S4 | 7/7 | 0 | 0 | | 7 |
| | | | | | |
| Total | 19 | 11 | 5 | | 35 |

Legenda: S1 – misturadora, S2 – picadora, S3 – parede da sala de enchimento, S4 - enchedora

Em suma, foi apenas na picadora (S2) e na parede da sala de enchimento (S3) que foi evidenciada a presença das três espécies de *Staphylococcus*. Na picadora ocorre a redução de tamanho das matérias primas principais, carne e gordura, sendo um equipamento de difícil higienização e portanto sendo possível a persistência de diferentes espécies bacterianas. As paredes são superfícies de cerâmica com diferentes características de polarização, que poderão facilitar ou não a adesividade de espécies diferentes. Estas últimas superfícies do ambiente fabril poderão também ser frequentemente negligenciadas em relação ao programa de higienização estabelecido.

3.2 Caracterização tecnológica das espécies de *Staphylococcus* presentes nas diferentes superfícies do ambiente fabril

Na Tabela 12 apresentam-se os resultados obtidos nas provas de interesse tecnológico efectuadas aos isolados de *Staphylococcus* em estudo.

Tabela 12 – Relação entre os resultados positivos nas provas de interesse tecnológico com as diferentes espécies consideradas

| | | <i>S. xylosus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. equorum</i> |
|-------------------------------|-----|-------------------|-------------------------|-------------------|
| Actividade Lipolítica | | 19/19 | 0 | 0 |
| Actividade Proteolítica | | 3/19 | 0 | 4/5 |
| Actividade Nitrato - Redutase | 7h | 1/19 | 0 | 0 |
| | 24h | 11/19 | 4/9 | 4/5 |
| | 48h | 12/19 | 9/9 | 4/5 |

Dos 19 isolados de *Staphylococcus xylosus*, apenas 3 apresentavam propriedades proteolíticas, todas pertencentes à Fábrica A e encontravam-se na picadora (S2, N=1) e na parede da sala de enchimento (S3, N=2). Já no que se refere à actividade lipolítica, todos os isolados pertencentes a esta espécie demonstraram esta capacidade. Nove dos isolados não apresentaram capacidade nitrato-redutase, pertencentes às Fábricas A (N=5) e B (N=4), encontrando-se na picadora e na parede da sala de enchimento. Os restantes isolados (N=12) evidenciaram esta propriedade redutora nas diferentes temperaturas 30°C, 20°C e 15°C. Apenas o isolado de *S. xylosus* S4B6 demonstrou capacidade de reduzir o nitrato a nitrito após incubação durante 7 horas a 42°C. Talon *et al.* (1999) observaram variabilidades ao nível da actividade nitrato redutase produzida por esta espécie, tendo Blaiotta *et al.* (2004) determinado que todas as estirpes de *S. xylosus* presentes no seu estudo eram capazes de reduzir o nitrato a nitrito a 30°C, o que está em concordância com os nossos resultados obtidos. Também Bonomo *et al.* (2009) reportaram que a maioria (75%) dos isolados desta espécie apresentavam actividade nitrato redutase. Garcia-Varona *et al.* (2000) caracterizaram as Micrococacceae isoladas de diferentes variedades de “Chorizo” e determinaram que 68% dos isolados de *S. xylosus* possuíam uma baixa actividade proteolítica, à excepção de uma estirpe isolada de um produto cárneo fermentado da Segovia que evidenciou possuir elevada capacidade nesta actividade. Mais de 90% destes *S.xylosus* possuíam actividade lipolítica, sendo a maior percentagem em níveis moderados, à excepção de estirpes isoladas do chouriço curado e semi curado da Segovia.

De entre os nove isolados de *Staphylococcus saprophyticus*, nenhum apresentou actividade proteolítica nem lipolítica. Relativamente à actividade nitrato redutase, após incubação a 30°C durante 24 horas, apenas 4 isolados desta espécie, pertencentes à Fábrica C e provenientes da misturadora, apresentaram esta actividade. Já a 20°C, após incubação durante 72 horas, todos os isolados apresentaram esta capacidade (N=9), sendo que os que apresentavam maior capacidade de actividade nitrato-redutase pertenciam à Fábrica C.

Contrariamente, Schleifer & Kloos (1975), ao analisarem oitenta e três isolados de *S. saprophyticus*, verificaram que nenhum apresentava esta actividade. Também Bonomo *et al.* (2009) observaram que nas estirpes desta espécie não era frequente esta actividade enzimática. Já a ausência das actividades proteolítica e lipolítica evidenciadas pelos isolados de *S. saprophyticus* do nosso estudo contrariam Samelis *et al.* (1998) que consideram esta espécie como responsável pelo desenvolvimento do aroma do Salame Grego. Por outro lado, Mauriello *et al.* (2004) sugeriram que as diferentes estirpes de *S. saprophyticus* podiam ajudar a prevenir o aparecimento do aroma a ranço durante a maturação por serem fracamente lipolíticas.

Os nossos isolados de *S. equorum* (N=5) presentes na picadora (S2) não apresentaram actividade lipolítica após 48h de incubação, tendo contudo quatro destes apresentado actividade proteolítica (S2M3, S2M4, S2M6 e S2M7). Com excepção da estirpe S2M8, todos tinham actividade nitrato-redutase. Bonomo *et al.* (2009), em isolados de *S. equorum* provenientes de um produto cárneo fermentado da região de Basilicata (Sul de Itália), verificaram que nenhum evidenciava actividade lipolítica mas todos apresentavam actividades proteolítica e nitrato redutase. Já Baruzzi *et al.* (2006) verificaram a fraca actividade lipolítica e proteolítica em estirpes de *S. equorum* isolados de produtos do Sul de Itália mas apresentando capacidades redutoras de nitrato.

3.3 Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* quanto à capacidade de formar biofilmes

3.3.1 Avaliação da capacidade de formar biofilme

Na Tabela 13 resumem-se os resultados de avaliação da capacidade de produção de visco nas espécies de *Staphylococcus* em estudo. Após a primeira avaliação às 24h de incubação dos isolados cultivados nas placas de CRA, observou-se que a estirpe de *S. equorum* S2M6 apresentou crescimento com colónias vermelhas, sendo a placa de cor vermelha, ou seja, negativa (-) quanto à produção de visco/biofilme (2,9%). Ainda na avaliação após 24h, 10 das estirpes de diferentes espécies apresentavam colónias cor de vinho no meio CRA, ou seja, revelaram ser fracas produtoras de visco/biofilme (+; 28,6%), entretanto 24 dos isolados apresentaram colónias de cor preta, tendo estas estirpes sido consideradas fortes formadoras de visco/biofilme (++; 68,5%).

Tabela 13 – Relação entre a capacidade de produção de biofilme pelo CRA e as diferentes espécies, às 24h e 48h.

| CRA | Não produtoras | | Fracas produtoras | | Produtoras | |
|-------------------------|----------------|-----|-------------------|-----|------------|-----|
| | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| <i>S. xylosus</i> | 0 | 0 | 6 | 1 | 13 | 18 |
| <i>S. saprophyticus</i> | 0 | 0 | 3 | 0 | 8 | 11 |
| <i>S. equorum</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | 4 |

Após 48h de incubação, a estirpe de *S. equorum* S2M6 não formadora de visco/biofilme (-) continuou a manifestar esta característica e de entre as estirpes fracas produtoras (+), 9 das 10 que se apresentavam às 24h cor de vinho passaram a pretas. Assim, 2,9% de estirpes revelaram ser fracas produtoras de visco/biofilme (+) e 94,2% foram consideradas fortes formadoras de visco/biofilme (++).

O resultado negativo obtido pode dever-se ou à não formação de visco/biofilme desta estirpe, ou a qualquer erro no procedimento laboratorial, uma vez que existem estirpes de *S. equorum* que não apresentam capacidade de formar biofilmes, ainda que a sua maioria isolada em ambientes fabris apresente esta capacidade, tal como descrito por Leroy *et al.* (2009).

Relativamente à espécie *S. xylosus*, 18 estirpes em estudo revelaram logo após 24h de incubação ter forte capacidade de formar visco/biofilme (++, 94,7%). Apenas uma estirpe apresentava fraca capacidade de formação de visco/biofilme (+, 5,3%), mantendo-se esta característica às 48h. Estes resultados são coincidentes com Planchon *et al.* (2006), uma vez que estes autores verificaram no seu estudo que em 12 isolados de *S. xylosus*, 11 apresentavam forte capacidade formadora de biofilme.

Cerca de 73% das estirpes de *S. saprophyticus* apresentaram às 24h forte capacidade formadora de visco/biofilme (++, 73%), sendo as restantes 27% fracas formadoras de visco/biofilme (+, 27%). Contudo, após 48h de incubação, todas as estirpes desta espécie vieram a apresentar forte capacidade de formação de visco/biofilme (++, 100%).

Na Tabela 14 resume-se os resultados da avaliação da capacidade de formar biofilme considerando a espécie encontrada distribuída pelas diferentes superfícies do ambiente fabril.

A estirpe de *S. equorum* S2M6 não produtora de visco/biofilme (-) encontrava-se na misturadora da Fábrica A. Já a estirpe de *S. equorum* S2M3 isolada na superfície da picadora da Fábrica A apresentou uma fraca capacidade formadora de visco/biofilme (+) às 24h, evidenciando esta característica de uma forma mais forte (++) às 48h. Uma das estirpes de *S. xylosus* (S2M7) fraca formadora de visco/biofilme (+) mesmo após 48h de incubação encontrava-se também na Fábrica A e na picadora.

As estirpes de *S. xylosus* (S3M5, S3M7, S3B7, S4B7 e S4B8) isoladas das Fábricas A e B nas paredes da sala de enchimento assim como na enchedora, manifestaram às 24h ser

fracas formadoras de visco/biofilme (+), contudo após 48h de incubação todas demonstraram ter uma forte capacidade de formar visco/biofilme (++)

As estirpes de *S. saprophyticus* presentes na misturadora (S1C1), na picadora (S2M1) e na parede da sala de enchimento (S3M1) tornaram-se fortes formadoras de visco/biofilme (++) após as 48h de incubação.

Tabela 14 – Relação entre o número de bactérias de cada espécie e suas capacidades de formar visco/biofilme às 24h e às 48h, de acordo com as diferentes superfícies do ambiente fabril

| Espécie | CRA | S1 | | S2 | | S3 | | S4 | |
|-------------------------|-----|-------|-------|-----|-----|------|-------|-------|-------|
| | | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| <i>S. xylosus</i> | + | ----- | ----- | 1/2 | 1/2 | 3/10 | 0/10 | 2/7 | 0/7 |
| | ++ | ----- | ----- | 1/2 | 1/2 | 7/10 | 10/10 | 5/7 | 7/7 |
| <i>S. saprophyticus</i> | + | 1/9 | 0 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | ----- | ----- |
| | ++ | 8/9 | 9/9 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | ----- | ----- |
| <i>S. equorum</i> | + | ----- | ----- | 1/4 | 0 | 0/1 | 0/1 | ----- | ----- |
| | ++ | ----- | ----- | 2/4 | 3/4 | 1/1 | 1/1 | ----- | ----- |
| TOTAL | | 9 | | 7 | | 12 | | 7 | |

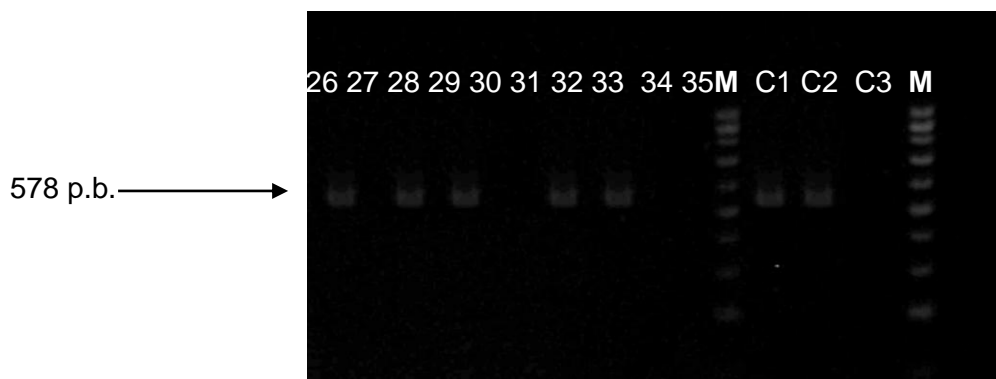
Legenda: + – fracas formadoras de visco; ++ – fortes formadoras de visco; S1 – misturadora; S2 – picadora; S3 – parede da sala de enchimento; S4 – enchedora

3.3.2 Caracterização genotípica da capacidade de formar biofilmes

3.3.2.1 Identificação do Gene *ica*

Na Figura 14 apresenta-se uma fotografia de um gel de agarose que revela os produtos de reacção PCR para pesquisa do gene *ica*. De todas as estirpes avaliadas, apenas 5 estirpes apresentaram este gene (S3B5, S3B7, S4B1, S4B5, S4B6). Das estirpes da espécie *S. xylosus* que apresentavam este gene (N=3), todas pertenciam a amostras da enchedora (S4B1, S4B5, S4B6), da Fábrica B, enquanto as duas estirpes da espécie *S. saprophyticus* pertenciam a isolados provenientes da parede da sala de enchimento (S3B5, S3B7) da mesma fábrica. Tal facto sugere que pode não existir relação entre o tipo de superfície (*inox* ou cerâmica) e a existência ou não do gene que expressa e forma o PIA, podendo desta forma encontrar-se em estirpes presentes em qualquer superfície do ambiente fabril, uma vez que estas duas superfícies apresentam características de adesão e polarização diferentes.

Figura 14 – Identificação genética do gene *ica*



Legenda: 26-35 – Isolados de *Staphylococcus*, dos quais 26, 28, 29, 32 e 33 aparecem como positivos; M – marcador; C1 – Controlo Positivo (*S. aureus* NCTC 8325), C2 – Controlo Positivo (*S. epidermidis* ATTC RP62A); C3 – Controlo Negativo (*S. saprophyticus* DSMZ 18669)

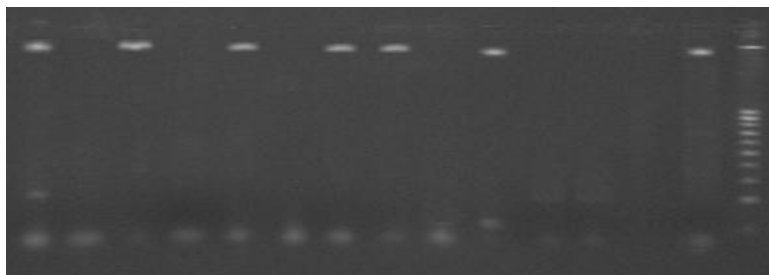
Das 5 estirpes positivas ao gene *ica*, todas apresentavam forte capacidade de formar biofilme, havendo no entanto uma *S. xylosus* (S3B7) que às 24h era fraca produtora, tendo posteriormente passado a forte produtora. Este facto de produção tardia da capacidade formadora de biofilme pode estar relacionado com a origem da estirpe e o meio onde se encontra. Na verdade, pode dever-se a uma característica da carga da membrana relativamente ao meio onde persistia, uma vez que forças iónicas diferentes criam uma repulsão na adesão, tendo sido posteriormente compensada pelas forças de Van der Waals, o que promove a adesão tardia caracterizada pela forte formação do *slime* após 48h (Planchon *et al.*, 2006). A presença do gene *ica* em estirpes de *S. xylosus* não é coincidente com os estudos de Planchon *et al.* (2006) onde não foi detectado este gene em nenhuma estirpe de *S. xylosus* estudada.

3.3.2.2 Identificação do Gene *Bap*

Como pode verificar-se na Figura 15, o gene *Bap* foi detectado em 6 estirpes, sendo que 2 pertenciam à espécie *S. saprophyticus* (S1B6 e S1B8) e 4 destas à espécie *S. xylosus* (S3B1, S3B4, S3B5 e S3B7). Todas estas estirpes provinham da Fábrica B, encontrando-se a espécie *S. saprophyticus* na misturadora (S1), enquanto as estirpes *S. xylosus* eram provenientes da parede da sala de enchimento (S3) e da enchedora (S4). Sendo todas estas estirpes provenientes da mesma fábrica, pode suspeitar-se de um cruzamento de informação genética entre diferentes espécies, de forma a aumentar a expressão de proteínas envolvidas na formação de biofilme (Tormo *et al.*, 2005).

Figura 15 – Identificação genética do gene Bap.

970 p.b.



Legenda: 1 – 31 – Isolados de *Staphylococcus*, entre os quais 1, 3, 22, 25, 26 e 28 aparecem positivos à presença do gene Bap; C1 – Controlo negativo (*S. epidermidis* ATTC RP62A); C2 – Controlo positivo (*S. simulans* DSMZ 20323); M – marcador

3.4 Relação entre as características tecnológicas e as avaliações fenotípicas e genotípicas para a avaliação da formação de biofilmes

Os resultados obtidos relativamente à caracterização tecnológica das estirpes em estudo e à identificação dos genes *ica* e Bap e avaliação da capacidade de formação de visco/biofilme às 24h e às 48h por cultura em meio CRA, com a fábrica e correspondentes superfícies encontram-se esquematizados na Tabela 15.

A espécie *S. xylosus* encontrava-se em maior percentagem (54,3%) relativamente às outras espécies, sendo que a espécie *S. saprophyticus* apareceu em 11 dos isolados (31,4%), tendo sido a segunda espécie mais encontrada. Já a espécie *S. equorum* apareceu em 14,2% (N=9) das amostras.

Na enchedora (S4) foi apenas identificada a espécie *S. xylosus*, tendo sido a parede da sala de enchimento (S3) aquela que contribuiu para um número tão elevado de amostras positivas desta espécie relativamente às outras. O facto de haver uma relação entre esta espécie e as duas superfícies poderia ser presumível, uma vez que ambas (S3 e S4) se encontram no mesmo espaço físico, havendo por isso probabilidade de contaminação cruzada entre as bactérias presentes na enchedora e as paredes desta sala. A dominância do *S. xylosus* em superfícies do ambiente fabril relativamente às outras espécies pode dever-se à maior capacidade de adesão desta espécie às superfícies de maquinaria fabril, uma vez que estas são feitas de aço inoxidável, com características de polarização favoráveis à adesão bacteriana, facto este também relatado por Moretro *et al.* (2003).

A espécie *S. saprophyticus* foi a única espécie encontrada na superfície da misturadora (S1), estando presente nas Fábricas B e C. Este facto pode dever-se à elevada hidrofobicidade da parede celular desta espécie, referenciada por Schenider *et al* (1991) como uma característica de virulência desta espécie.

Na superfície da picadora (S2), a espécie mais encontrada foi a *S. equorum* (57,1%). O facto de o *S. equorum* ser uma espécie com enorme adaptabilidade e persistência em ambientes alimentares, mesmo naqueles onde não é utilizado como *starter*, é considerado

um bom modelo de medida de contaminação cruzada entre as superfícies fabris e os produtos lá processados. Por isso, é importante verificar também a sua capacidade em produzir biofilme, de forma a poder determinar-se esta característica como vantajosa ou não evitando-se a colonização de bactérias patogénicas em superfícies (Leroy *et al.*, 2009).

Para a avaliação fenotípica da capacidade de formar visco/biofilme utilizou-se o método CRA – Congo Red Agar, caracterizando-se as amostras de acordo com a cor obtida (vermelho, cor de vinho e preto) e passando-se a uma avaliação qualitativa de não formador (-), fraco formador (+) e forte formador (++) de visco/biofilme, após incubações de 24h e fez-se uma posterior avaliação às 48h. Neste método, foi apenas determinada uma amostra negativa, pertencente à espécie *S. equorum*. Este resultado pode dever-se ou à não formação de biofilmes desta estirpe, uma vez que existem estirpes de *S. equorum* que não apresentam esta capacidade (Leroy *et al.*, 2009) ou a qualquer erro no procedimento laboratorial.

Cerca de 1/3 dos isolados apresentaram fraca capacidade em formar visco/biofilme. Tal facto pode dever-se às diferentes condições (temperatura, tempo de incubação, humidade, ...) que cada estirpe precisa para criar o *slime*, considerando como exemplo a espécie *S. saprophyticus* que apresentava 3 estirpes fracas produtoras de visco/biofilme às 24h, sendo que todas passaram a fortes produtoras de visco/biofilme após as 48h, sucedendo-se o mesmo com as estirpes de *S. xylosus* que às 24h tinha 3 isolados fracos formadores de visco/biofilme e após as 48h apresentava apenas uma estirpe fraca formadora de visco/biofilme. Não foi possível discutir os resultados obtidos entre a relação das espécies com a capacidade de formação ou não formação de visco/biofilme dependendo das superfícies, uma vez que a disposição dos dados era demasiado homogénea.

Como avaliação genotípica da capacidade de formar biofilme, identificaram-se dois genes implícitos no processo de formação de biofilme, o gene *ica* e o gene Bap. O facto de existirem amostras positivas ao gene *ica* em diferentes superfícies sugere que pode não existir relação entre a superfície e a existência ou não deste gene. Em relação à detecção do gene Bap, foram encontradas 6 amostras positivas, duas delas concomitantes à presença de *ica*, pertencentes à espécie *S. xylosus* (S3B5 e S3B7). Das amostras positivas ao Bap, todas eram fortes produtoras de visco/biofilme após 24h à excepção da amostra de *S. xylosus* positiva também ao *ica* que apresentava fraca capacidade às 24h. Tal facto pode dever-se ou à razão justificada acima, relativa às diferentes condições implícitas na formação de visco/biofilme, ou a uma falha de leitura, uma vez que a avaliação das placas de CRA é uma avaliação qualitativa entre 3 variáveis (vermelho, cor de vinho e preto). Desta forma, sugere-se que a avaliação do CRA em estudos posteriores seja feita de acordo com Arciola (2002), onde é utilizada uma escala colorimétrica de 5 escalões (muito vermelho, vermelho, cor de vinho, preto e muito preto) em vez dos 3 utilizados neste estudo.

Tabela 15 – Relação entre as Fábricas e correspondentes superfícies com as estirpes identificadas de acordo com as suas características tecnológicas, presença dos genes implícitos na formação de biofilme e capacidade de formação de visco/biofilme após 24h e 48h de incubação

| FÁBRICA | CÓDIGO | IDENTIFICAÇÃO | Act. Lipol. | Act. Proteol. | Act. Nitrato-Redutase | | | ICA | BAP | CRA 24h | CRA 48h | Superfície |
|---------|--------|-------------------------|-------------|---------------|-----------------------|------|------|-----|-----|---------|---------|------------------------|
| | | | | | 42º | 30º | 20º | | | | | |
| M | S2M1 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | +++ | - | - | cv | p | Picadora |
| | S2M2 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | ++++ | ++++ | - | - | p | p | |
| | S2M3 | <i>S. equorum</i> | - | + | - | +++ | +++ | - | - | cv | p | |
| | S2M4 | <i>S. equorum</i> | - | + | - | + | ++ | - | - | p | p | |
| | S2M6 | <i>S. equorum</i> | - | + | - | + | ++ | - | - | v | v | |
| | S2M7 | <i>S. xylosus</i> | + | + | - | + | ++ | - | - | cv | cv | |
| | S2M8 | <i>S. equorum</i> | - | + | - | - | - | - | - | p | p | |
| | S3M1 | <i>S. saprophyticus</i> | + | - | - | - | - | - | - | cv | p | Parede sala enchimento |
| | S3M3 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | - | - | - | p | p | |
| | S3M4 | <i>S. equorum</i> | - | - | - | ++ | ++ | - | - | p | p | |
| | S3M5 | <i>S. xylosus</i> | + | + | - | - | - | - | - | cv | p | |
| | S3M7 | <i>S. xylosus</i> | + | + | - | - | - | - | - | cv | p | |
| B | S1B6 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | + | - | + | p | p | Misturadora |
| | S1B7 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | + | - | - | p | p | |
| | S1B8 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | + | - | + | p | p | |
| | S3B1 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | - | - | + | p | p | Parede sala enchimento |
| | S3B2 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | - | - | - | p | p | |
| | S3B3 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | - | - | - | p | p | |
| | S3B4 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | - | - | + | p | p | |
| | S3B5 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | +++ | +++ | + | + | p | p | |
| | S3B6 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | ++ | ++ | - | - | p | p | |
| | S3B7 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | + | ++ | + | + | cv | p | |
| | S4B1 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | - | + | + | - | p | p | Enchedora |
| | S4B2 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | ++ | ++ | - | - | p | p | |
| | S4B4 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | +++ | +++ | - | - | p | p | |
| | S4B5 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | +++ | +++ | + | - | p | p | |
| | S4B6 | <i>S. xylosus</i> | + | - | + | ++ | ++++ | + | - | p | p | |
| | S4B7 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | ++ | +++ | - | - | cv | p | |
| | S4B8 | <i>S. xylosus</i> | + | - | - | +++ | +++ | - | - | cv | p | |
| C | S1C1 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | + | - | - | cv | p | Misturadora |
| | S1C4 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | +++ | ++++ | - | - | p | p | |
| | S1C5 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | ++++ | ++++ | - | - | p | p | |
| | S1C6 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | ++++ | ++++ | - | - | p | p | |
| | S1C7 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | +++ | +++ | - | - | p | p | |
| | S1C8 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - | ++ | - | - | p | p | |

Legenda: - - negativo; + - positivo; ++ - moderadamente positivo; +++ - forte positivo; ++++ - muito forte positivo;

V – vermelho (não formadoras); CV – cor de vinho (fracas formadoras); P – preto (fortes formadoras)

De entre as estirpes possuidoras do gene Bap, todas provinham da mesma fábrica (B) podendo sugerir o cruzamento de informação entre diferentes estirpes de *Staphylococcus*, de forma a aumentar a expressão de genes implícitos na formação de biofilme.

Todas as estirpes positivas à detecção do gene Bap eram fortes produtoras de biofilmes às 48h, havendo, no entanto, uma estirpe de *S. xylosus* (S3B7) também positiva ao gene *ica* que apresentava uma fraca capacidade às 24h. Este facto pode sugerir que outros genes são responsáveis pela expressão de proteínas implicadas na formação de biofilme, apoiando-se esta observação no facto de que todas as estirpes em estudo apresentavam-se como fortes formadoras de biofilme após 48h de incubação.

A não-expressão dos genes *ica* e Bap, ainda que haja formação de visco/biofilme através de métodos de avaliação fenotípicos sugere que existam outros genes responsáveis pela expressão de proteínas implicadas na formação de biofilme.

Stahnke (1995) propôs a utilização de culturas *starter* com actividade lipolítica para influenciar o desenvolvimento do aroma nos produtos cárneos fermentados. Através da presença da actividade proteolítica, originam-se compostos não-voláteis e voláteis, em grande parte devido à degradação de aminoácidos livres e à inibição da oxidação de ácidos gordos insaturados livres, os quais participam no desenvolvimento do sabor do produto cárneo fermentado seco. Desta forma, as estirpes a seleccionar como culturas *starter* deverão apresentar não só a capacidade de redução do nitrato a nitrito (actividade nitrato redutase) como também actividade lipolítica e proteolítica moderadas. Apenas estirpes com características similares, isto é, fraca actividade lipolítica e proteolítica e com actividade nitrato redutase devem ser seleccionadas como culturas *starter* (Garcia-Varona *et al.*, 2000). O facto do género *Staphylococcus* ser utilizado como *starter*, graças às suas capacidades fermentativas e redutoras e apresentar capacidade de formação de biofilme pode ser visto como uma desvantagem, uma vez que há possibilidade de existir uma relação entre a patogenicidade das estirpes e a capacidade de formação de biofilme (Cucarella *et. al*, 2001; Gotz *et. al*, 2002; Latasa *et. al*, 2006). Considera-se, no entanto, uma vantagem no sentido em que o biofilme pode apresentar-se como uma protecção do alimento contra outros agentes microbianos, nomeadamente agentes patogénicos para além de outros deteriorativos, como referenciado por Villani *et al.* (1997) e Martín *et al.* (2006), sendo por isso vantajoso que permaneçam no ambiente fabril de forma a prolongar o tempo de vida útil dos alimentos.

Desta forma, poder-se-ia seleccionar como estirpe potencialmente capaz de funcionar como *starter*, a estirpe de *Staphylococcus xylosus* S2M7, pertencente à Fábrica A e tendo sido isolada na picadora, uma vez que apresenta actividades tecnológicas favoráveis a esta função e não apresenta os genes *ica* nem Bap, podendo desta forma ser considerada uma estirpe segura no sentido de não evidenciar características de patogenicidade mas com fraca capacidade produtora de visco/biofilme aderindo às superfícies do ambiente fabril.

4. CONCLUSÕES

Um dos objectivos deste estudo prendia-se na identificação e caracterização dos isolados estafilocócicos, de forma que estes foram caracterizados de acordo com a fábrica e a superfície em que se encontravam.

Foram isoladas diferentes amostras (N=78) de 4 superfícies diferentes provenientes de 3 fábricas do Alentejo, após o qual se fez identificação fenotípica e genotípica de forma a identificar-se espécies de *Staphylococcus*.

Dos 78 isolados, 35 foram identificadas com o género *Staphylococcus*, tendo origem em 3 fábricas diferentes. As espécies dominantes encontradas foram *S. xylosus* (N=19), *S. saprophyticus* (N=11) e *S. equorum* (N=5).

O *S. xylosus* foi a espécie mais encontrada aparecendo com mais frequência nas superfícies das enchedoras. O *S. equorum* foi apenas isolado na 1ª fábrica considerada, tendo aparecido tanto na picadora (N=4) como na parede da sala da enchedora (N=1).

Relativamente às superfícies, a parede da sala da enchedora (S3) foi a que apresentava maior número de isolados identificados (N=12). Na enchedora (S4) encontraram-se isolados de *S. saprophyticus* (N=9), tendo estes sido provenientes de duas fábricas diferentes (A e B), enquanto na misturadora (S1) se encontrou apenas *S. xylosus* (N=7), tendo estes sido todos isolados da mesma fábrica (B).

Tanto na picadora (S2) como na parede da sala de enchimento (S3) encontraram-se amostras das 3 espécies. No entanto, os isolados provenientes da parede da sala de enchimento (S3; N=12) eram maioritariamente compostos por *S. xylosus* (N=10), enquanto a picadora (S2) apresentava uma variedade mais heterogénea relativamente à proporção destas.

Foram estudadas as actividades lipolítica, proteolítica e nitrato-redutase dos 35 isolados presuntivos do género *Staphylococcus* e determinou-se que a estirpe S2M7 de *S. xylosus* apresentava características coincidentes à de *starter*, uma vez que apresentou capacidades nas 3 actividades, com a capacidade redutora de nitrato em valores elevados, satisfatórios a esta característica.

O segundo objectivo desta dissertação prendia-se na determinação da capacidade que estas diferentes estirpes de estafilococos coagulase negativos apresentavam em formar biofilmes, tendo para isso sido utilizados métodos de avaliação fenotípica e genotípica.

Dentro dos 35 isolados de *Staphylococcus* em estudo, após 24h, a maioria destas apresentava já uma forte capacidade fenotípica de formação de biofilme (++;N=24), tendo este número aumentado após as 48h (++;N=33).

Apenas a estirpe *S. equorum* S2M6 não apresentou capacidade de formação de visco/biofilme, existindo estirpes das 3 espécies de *Staphylococcus* identificadas com características de fracas (+) e fortes formadoras (++) de visco/biofilme.

As estirpes de *S. xylosus* (N=19) em estudo, eram maioritariamente fortes formadoras de visco/biofilme (++;N=18). Todas as estirpes de *S. saprophyticus* (N=11) apresentavam forte capacidade de formar visco/biofilme (++;N=11) às 48h.

Da totalidade das estirpes em estudo, existia um pequeno número de amostras positivas para ambos os genes *ica* e Bap (*ica*: N=5; Bap: N=6). Nas amostras positivas ao *ica*, todas apresentavam forte capacidade formadora de visco/biofilme, de acordo com os métodos fenotípicos efectuados (N=5:*ica*:+;CRA:++). A estirpe *S. xylosus* S3B7 apresentando o gene Bap foi fraca formadora de visco/biofilme, enquanto as restantes eram fortes formadoras de visco/biofilme (N=5:Bap+;CRA++ e N=1:Bap+;CRA+). As estirpes S3B5 e S3B7 eram portadoras dos genes *ica* e Bap simultaneamente (N=2:*ica*+;Bap+). Contudo, às 24h uma delas apresentou-se como fraca formadora de visco/biofilme, enquanto a outra foi forte formadora de visco/biofilme (N=1:*ica*+;Bap+;CRA+ e N=1:*ica*+;Bap+;CRA++). Às 48h ambas apresentaram forte capacidade formadora de visco/biofilme (N=2:*ica*+;Bap+;CRA++).

Todas as amostras onde se caracterizou o *ica* eram pertencentes à espécie *S. xylosus* (N=6), pertencentes à mesma fábrica (B) e pertenciam todas ao espaço físico onde se encontrava a enchedora (S3 e S4).

Das amostras identificadas com o Bap (N=6), havia estirpes das espécies *S. xylosus* (N=4) e *S. saprophyticus* (N=2) e todas pertenciam também à Fábrica B. No entanto, as estirpes pertencentes à espécie *S. saprophyticus* encontravam-se na misturadora (S1) e as pertencentes à espécie *S. xylosus* encontravam-se no mesmo espaço físico, correspondentes à parede da sala de enchimento (S3) e à enchedora (S4) sendo as amostras desta espécie aquelas onde foi também identificado o gene *ica*. Este facto leva a considerar que poderá existir entre a microflora da casa trocas genéticas entre si, o que leva a que estirpes de diferentes espécies apresentem genes que são mais comuns a espécies potencialmente patogénicas, como o *S. saprophyticus*.

Seleccionou-se como estirpe potencialmente capaz de funcionar como *starter* a estirpe de *Staphylococcus xylosus* S2M7, pertencente à Fábrica A e tendo sido isolada na picadora, uma vez que apresenta actividades tecnológicas favoráveis à função de *starter* e não apresenta os genes *ica* nem Bap, podendo desta forma ser considerada uma estirpe segura no sentido de não evidenciar características de patogenecidade mas com fraca capacidade produtora de visco/biofilme aderindo às superfícies do ambiente fabril.

BIBLIOGRAFIA

- ABIS – Advanced Bacterial Identification Software (2011) *Regnum prokaryotae* ()
- Almeida R.A., Oliver S.P. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* Vol. 31(No. 5), 205-12.
- Araújo, E.A. & Andrade, N.J. (2010). Aspectos coloidais da adesão de microorganismos, *Química Nova*, Vol. 33 (No. 9), 1940-1948
- Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Sétrin, S., Berdagué, J.L. & Talon, R., (2001). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 20,181–185
- Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L. & Morea, M. (2006). Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science*, 72, 261-269.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C. & Talon, R. (1993) Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, Vol. 35, 275–287.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. & Parente, E., (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 97, 271–284.
- Bockelmann, W. (2002). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses, *International Dairy Journal*, Vol. 12, 123–131
- Boles, B. & Horswill, A. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly, *Trends in Microbiology*, Vol. 19 (9)
- Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Sico, M.A. & Saltzaro, G. (2009). Technological and safety characterization of coagulase-negative *staphylococci* from traditionally fermented sausage of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 83, 15-23.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. & Fontaine, M.N. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65 (125), 328-5333
- Butler, J. P. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology* - Volume 1. Williams & Wilkins Editora: U.S.A., ISBN: 0-683-04108-8
- Caixeta, D. S. (2008). Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável; Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, Lavras (Brasil)
- Carpentier, B. & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol. 75, 499–511.
- Carvalho, L. (2010). Identificação e caracterização de isolados de *Staphylococcus*: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: FMV – UTL.
- Casalini, J. (2008). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos. Dissertação da disciplina Seminários em Alimentos. Pelotas: UP Brasil

- Chokr, A., Watier, D., Eleaume, H., Pangon, B., Ghnassia, J.C., Mack, D. & Jabbouri, S. (2006), Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide, intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 296, 381–388
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, Vol. 284, 1318–1322.
- Coton, E.; Desmonts, M.H.; Leroy, S.; Coton, M. & Jamet, E. (2010) - Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples, *International Journal of Food Microbiology*, 137, 221–229
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schell, N.F., Nichols, W.W. & Gotz F. (1999) The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *American Society for Microbiology*, Vol. 67 (No. 10), p. 5427–5433
- Cucarella, C. (2001), Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J. Bacteriol.* Vol. 183, 88–96
- Cunha M.L., Sinzato & Y.K.; Silveira, L.V. (2004). Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol.99 (No.8)
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167–193.
- Drosinos, E.H.; Mataragas, M.; Xiraphi, N.; Moschonas, G.; Gaitis, F.; Metaxopoulos (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, Vol. 69, 307-317.
- Elias, M., Fraqueza, M.J. & Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico de chouriço tradicional alentejano. *Revista portuguesa de Zootecnia*, Vol. XIII (I), 1-12.
- Elias, M. & C. Baixinho (2007) - Condições ambientais das etapas de fabrico de um tipo de paio de porco da raça Alentejana. *Revista de Ciências Agrárias*. Vol. 30 (No.1)
- Esteves, A. (2005). Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.. Tese de Doutoramento. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Euzéby, J.P. (2011). List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN). (www.bacterio.net)
- FAO, Small-scale sausage production; FAO animal production and health paper 52, Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome, 1985
- Favero, M.S., Drake, C.H., Randall, M.S. (1964), Use of Staphylococci as Indicators of Swimming Pool Pollution, *Public Health Reports*, Vol. 79 (No. 1), 61-70
- Fiorentini, A.M., Sawitzki M.C., Bertol, T.M., Sant'Anna, E.S. (2009), Viability of *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal sausages for application as starter cultures in meat products, *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 40, 129-133
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'Gara, J.P. (2006) Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus* clinical isolates. *J. Hosp. Infect.*, Vol. 62, 120–122

Flach, J., Karnopp, C. & Corção, G. (2005). Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Vol 33 (No. 3), 291-296

Flemming, H.C., Neu, T.R. & Wozniak, D.J. (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells” (Guest comentary), *Journal of Bacteriology*, Nov. 2007, 7945–7947

Fraqueza, M.; Barreto, A.. & Ribeiro, M. (2007). HACCP. *In*: Toldrá, F; Hui, Y.; Astiasarán, I.; Nip, W.; Sebranek, J.; Silveira, E.; Stahnke, L. & Talon, R. (2008). Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 978-0-8138-1477-3. pp. 513-534.

García-Varona, M., Santos, M., E., Jaime, I. & Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 189-195.

Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, Vol. 187 (No. 7), 2426-2438.

Gotz F., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O. & Gerke C. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*, Vol. 273, 18586–18593.

Götz, F. (2002), *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, Vol. 43, 1367–1378.

Hammes, W. P. & Hertel, C. (1995). New Developments in Meat Starter Cultures, *Meat Science*, Vol. 49, (No. 1), 25-38

Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S. & Ohta, T. (2008) Methicillin-resistant *S. saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *me* have emerged in urogenital tract infections, *American Society for Microbiology*, Vol. 52 (No. 6), 2061-2068

Hulse, J. (2004). Biotechnologies: past history, present state and future prospects, *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 15, 3-18

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 236, 163–173

Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. (1986). Genus *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL. *In*: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2., The Williams and Wilkins Co.: Baltimore, 1013–1035.

Kramlich, W. E. (1976). Embutidos. *Ciencia de la Carne y de los productos cárnicos*. Ed.j.F. Price e Schweigert, Acribia: Zaragoza, España. 493-523.

Latasa, C., Solano, C., Penadés, J.R., Lasa I., (2006), Biofilm Associated Proteins, *C. R. Biologies*, Vol. 329, 849-857

Leroy, S., Lebert, I., Chacornac, J.P., Chavant, P., Bernardi, T., Talon R. (2009). Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *Food Microbiology*, Vol. 134, 46-51

Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J.P., Lebert, I. & Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology*, Vol. 27, 294-301

Lucchesi, E.G. (2006). Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

Mack D., Fischer W. & Krokotsch A. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear J3 (1 &)-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacterial*, Vol. 178: 175-183.

Mack, D. (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation, *Journal of Hospital Infection*, Vol. 43 (In suplement), 13-25

Mancinelli, R. & Shulls, W. A., Airborne Bacteria in na Urban Environment (1978), *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 35 (No. 6), 1095-1101

Martín, B, Garriga, M, Hugas, M, Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T. & Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 107; 148-158.

Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Vilanni, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy, *Meat Science*, 67, 149-158

Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.L. & Rousset-Akrim, S. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, Vol. 13, 489–499.

Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R., 2007. Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 102, 238-244.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorema, D. & Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review, *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK

Navarre W.W. & Schneewind O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol Mol Biol Mag.*, Vol. 63 (No.1), 174-229.

Norma ASTM270/A270M (2010) - Standard Specification for Seamless and Welded Austenitic Stainless Steel Sanitary Tubing

Norma ISO 18593 (2004) – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

O'Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 270, 179–188

Olesen, P.T., Meyer, A.S., Stahnke, L.H. (2004) Generation of flavour compounds in fermented sausages — the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 120X1056ffbeda%Vol. 66, 675-687

Palmer, J., Flint, S. & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 34, 577 – 581

Park, S., Kelley C., Vinogradov, E. & Lee, J. (2010). Characterization of the Structure and Biological Functions of a Capsular Polysaccharide Produced by *Staphylococcus saprophyticus*, American Society for Microbiology - J Bacteriology, Vol. 192 (No. 18), 4618-4626

Planchon, S., Gaillard-Martinie B., Dordet-Frisoni E., Bellon-Fontaine M.N., Leroy S., Labadie J., Hébraud M. & Talon R. (2006). Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*, *International Journal of Food Microbiology* Vol. 109, 88–96

Percival, S., Knapp, J.S., Edyvean G. & Wales, D.S. (1997). Biofilms, mains water and stainless steel, *Water Resolutions*, Vol. 32 (No. 7), 2187-2201

Pezacki, W. (1979). Some Basic facts about dry sausages manufacture, *Fleischwurst mag.*, Vol. 59 (No. 2), 219 – 223

Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. & Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* ssp *linens*, ssp *nov.*, a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiology*, Vol. 25, 30-37.

Prescott, Harley and Klein (2008). *Microbiology*. 7ª Edição. USA: McGraw Hill. ISBN: 978-0-07-110231-5

Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à higiene dos géneros alimentícios (29 de Abril de 2004); *Jornal Oficial da União Europeia*; L 139/1

Robinson, R. K. (2008), Encyclopedia of food microbiology. San Diego, U.S.A.: Academic press; Elsevier. e-ISBN: 978-0-08-052359-0

Rodríguez, M., Nuñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, E. & Asensio, M.A. (1996). Gram positive catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, 1897–1902

Romeo, T. (2008). Bacterial biofilms book, U.S.A: Springer ed.; ISBN 978-3540754176

Soares, J., Marques, M.R., Tavará, F.K., Pereira, J. O., Malcata, F. X. & Pintado, M.M. (2011). Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 146, 123–129

Seo Y., Lee, D.Y., Rayamahji, N., Kang M.L. & Yoo, H.S. (2008). Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air, *Research in Veterinary Science*, Vol. 85, 433–438

Sousa, M. & Ribeiro, A. (1983). Chouriço de carne português: Tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica, *Indústria Alimentar*. Vol. I, 14-23.

Schneider, P. F. & Riley, T. V. (1991); Cell-Surface Hydrophobicity of *Staphylococcus saprophyticus*; *Epidemiology and Infection*; Vol. 106 (No. 1), pp. 71-75

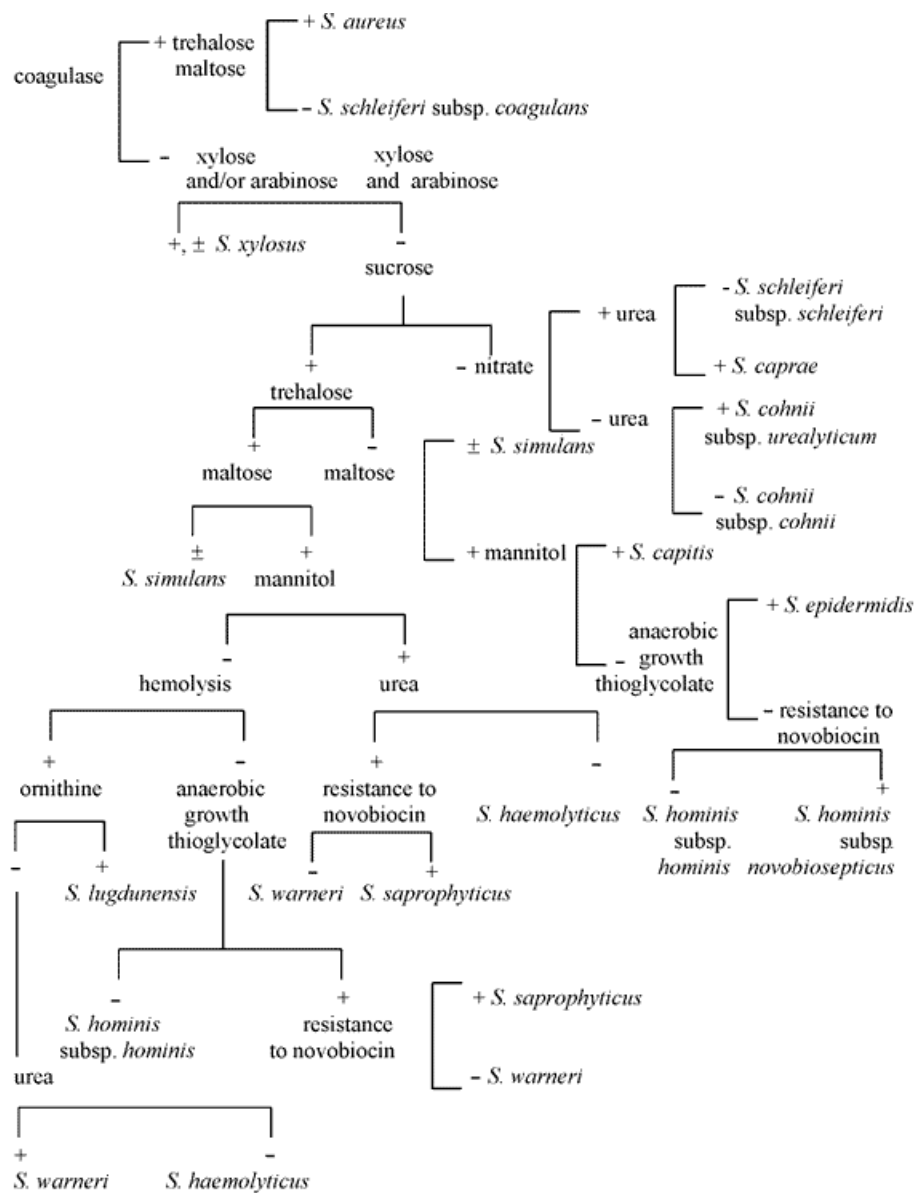
Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. *Meat Science*, 41, 179-223

Stahnke, L.H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. & Zanardi, E. (2002) Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus* — Relationship between maturity and flavor compounds. *Food Science*, Vol. 67, 1914–1921

- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment, *Trends in Microbiology*, Vol.9 (No.5), 222-227
- Talon, R., Alter, D., Chartier, S., Barrière, C. & Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 52, 47-56
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. & Fadda, S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products, *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Vol. 10, 175–191.
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., Lauková, A. (2007a). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*. Vol. 77, 570-579
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, J. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat product: the importance of indigenous starters, *Meat Science*, Vol. 77, 55-62
- Tormo, M.A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., Penadés, J.R., (2005), Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, Vol. 151, 2465–2475.
- Trachoo, N. (2008). Biofilms and the food industry, *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, Vol. 25 (No. 6), 808-813
- Varnam, A. & Sutherland, J. (1995). Meat and meat products. Technology, chemistry and microbiology, *Food Products Series* - Vol. 3. London: Chapman & Hall.
- Villani, F., Sannino, L., Moschetti, G., Mauriello, G., Pepe, O., Amodio-Cocchieri, R. & Coppola, S. (1997). Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages, *Food Microbiol.*, Vol. 14, 555–566
- Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R. & Otto M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, Vol. 279, 881–886.
- Widerstöm, M. (2007). Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J Clin Microbiol*, Vol. 45 (No.5), 61–64.

ANEXOS

Anexo 1 – Esquema simplificado para a identificação de espécies de *Staphylococcus* (adaptado de Kloos *et al*, 1986, citado por Cunha, 2004)



Legenda: +: positivo; -: negativo; +, -: positivo ou negativo; ±: fraco

